VERSUCHE ZU EINER Cu^{2+}-KATALYSIERTEN HYDROXYLIERUNG

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

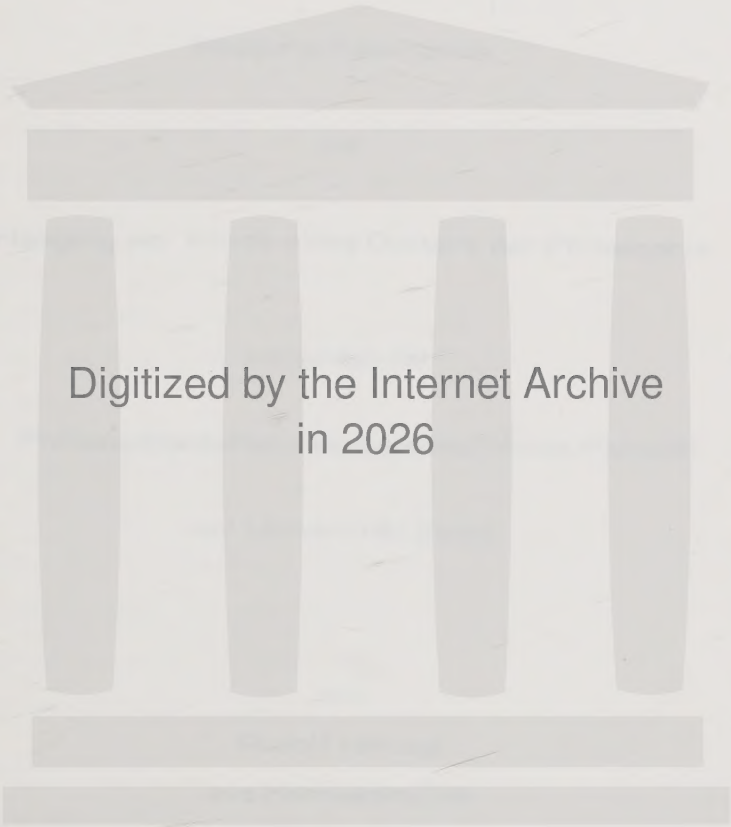
von

Rudolf Herzog

aus Hornussen/AG

Clausthal-Zellerfeld, 1971

Bönecke-Druck



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0065

VERSUCHE ZU EINER Cu^{2+}-KATALYSIERTEN HYDROXYLIERUNG

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Rudolf Herzog

aus Hornussen/AG

Clausthal-Zellerfeld, 1971

Bönecke-Druck

Genehmigt von der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag der Herren

Prof. Dr. S. Fallab

und

PD Dr. H. Sigel

Basel, den 9. März 1971

Prof. Dr. H.P. Laubscher

Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

THEORETISCHER TEIL 1

1. Problemstellung 1

2. Einleitung 2

3. Auswahl und Synthese der Modellverbindungen 12

4. Eigenschaften der Modellverbindungen 15

5. Wahl der Bedingungen für die Hydroxylierungsversuche 18

6. Methoden zur Auswertung von Hydroxylierungsversuchen 19

7. Hydroxylierungsversuche mit Cu^{2+} und H_2O_2 25

8. Andere Hydroxylierungsversuche 32

9. Oxydationsversuche mit C_{13}-Benzaldimin und Picolylamin; Oxydationsempfindlichkeit anderer Verbindungen 33

10. Diskussion 36

EXPERIMENTELLER TEIL 41

1. Allgemeines 41

2. Synthesen der Modellverbindungen 42

3. Synthesen der Referenzsubstanzen 45

4. Hydroxylierungsversuche 46

5. Produktanalysen 47

ZUSAMMENFASSUNG 49

LITERATURVERZEICHNIS 51

CURRICULUM VITAE 54

Verzeichnis der Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen und Symbole verwendet:

DC	Dünnschichtchromatographie Dünnschichtchromatogramm
EN	Aethylendiamin
EtOH	Aethylalkohol
GC	Gaschromatographie Gaschromatogramm
IR	Infrarotspektroskopie
PEN	N-(α-picolyl)-äthylendiamin
t_R	Retentionszeit
UV	Elektronenspektroskopie

THEORETISCHER TEIL

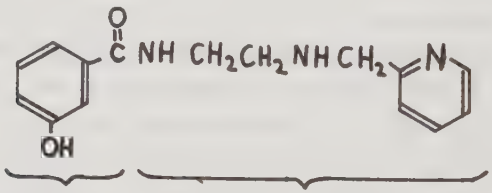
1. Problemstellung

Unter Hydroxylierung verstehen wir die Substitution eines Wasserstoffatoms durch eine Hydroxylgruppe in einem, meist aromatischen, Substrat. Solche Reaktionen sind in der Natur durch Enzyme (Hydroxylasen) katalysiert. Da die Aufklärung der Wirkungsweise in den enzymatischen Systemen auf grosse Schwierigkeiten stösst, sind viele Versuche unternommen worden, die Hydroxylierungen durch nichtenzymatische Modellsysteme zu simulieren. In der Einleitung wird eine Zusammenstellung von einigen, für uns interessanten, enzymatischen und nichtenzymatischen Hydroxylierungssystemen gegeben. Die bekannten, nichtenzymatischen Hydroxylierungssysteme sind mehr oder weniger selektiv bezüglich der Produktisomerenverteilung, aber keines davon ist produktspezifisch. Sie können also allenfalls als Modelle für die unspezifischen, nicht aber für biosynthetisch wirksame Hydroxylasen dienen. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass keine Bindung zwischen dem Substrat und dem zur Ausbildung der aktiven Sauerstoffspezies befähigten Ligandsystem besteht. Oder um den Vergleich mit Enzymen zu ziehen, die im "Coenzym" vorhandene Reaktionsfähigkeit wird nicht durch ein "Apoenzym" substrat- und wirkungsspezifisch gelenkt. Da das Apoenzym in biologischen Reaktionen zumeist aus einem Protein gebildet wird, ist es auch kaum möglich, überschaubare und wirklichkeitsnahe, spezifische Modelle zu entwerfen.

Folgende Idee liegt der vorliegenden Arbeit zugrunde. Bei einem aktiven Ligand-Metall-System, das eine hydroxylierbare Gruppe im eigenen Molekül besitzt, müsste, bei günstigen sterischen Gegebenheiten, eine gewisse Wirkungsspezifität zu beobachten sein. Nennen wir den komplexbildenden Teil des Moleküls Aktivatorteil

und den andern Substratteil. Als Aktivatorteil sollte eine zur Chelatbildung befähigte, stickstoffhaltige Kette dienen, wie solche im Arbeitskreis von Prof. Fallab im Hinblick auf die Bildung von O_2-Addukten schon öfters untersucht wurden [34]. Für den Substratteil entschlossen wir uns für Benzolringe, die in meta-Position zur Verknüpfungsstelle mit dem Aktivatorteil schon eine Hydroxylgruppe aufweisen.

zum Beispiel:



Substratteil Aktivatorteil

Welches Metallion verwendet werden, und ob molekularer Sauerstoff oder H_2O_2 als Sauerstofflieferant eingesetzt werden sollte, musste aufgrund von Vorversuchen entschieden werden.

Eine weitere Frage ist bei der entworfenen Arbeitshypothese notwendigerweise mit impliziert. Sind stickstoffhaltige, gesättigte Kettenmoleküle, die zur Chelatbildung befähigt sind, tatsächlich auch zur Ausbildung von im Sinne von Hydroxylasen aktiven Spezies befähigt?

2. Einleitung

Für zahlreiche biologische Oxydations-Reduktions-Reaktionen sind Eisen- oder Kupferionen essentiell. In den meisten Fällen, insbesondere bei den Cu^+- bzw. Cu^{2+}-Ionen ist dabei die Rolle der Metallionen nicht geklärt. Einige Bücher [1,2,3] und Uebersichtsartikel [4,5,6,7] ....

beschäftigen sich mit dem Sauerstoffmetabolismus wie auch mit Versuchen, in Modellreaktionen die enzymatischen Umsetzungen zu simulieren.

2.1. Kupferenzyme

Da in unserer Arbeit Kupferionen als katalysierende Metallionen gewählt wurden, sind hier einige der wichtigsten, redoxaktiven Kupferenzyme zusammengestellt.

Cytochrom c Oxydase, welche nach Slater [8] wahrscheinlich für mehr als 90 % des biologischen Sauerstoffverbrauches direkt verantwortlich ist, enthält neben Eisen- auch Kupferproteine.

In der tiefblauen, seit über achtzig Jahren bekannten, Laccase [9] in Pflanzen konnte sowohl Cu^{+} wie auch Cu^{2+} nachgewiesen werden. Als Substrate für Laccase kommen viele Mono- und Polyphenole sowie Aryldiamine und Ascorbinsäure in Frage.

Ascorbinsäure-Oxydase [10], ein weiteres Kupferprotein, katalysiert die aerobe Oxydation von Vitamin C zu Dehydroascorbinsäure und Wasser bei Atmungsvorgängen und metabolischen Prozessen in Pflanzen und Mikroorganismen.

Cu^{2+}-Ionen findet man auch in einigen der verschiedenen Aminoxydasen [11], die primäre Amine mit Hilfe von Sauerstoff und Wasser in den entsprechenden Aldehyd, Ammoniak und Wasserstoffperoxid überführen können. Aminoxydasen werden in Tieren, Pflanzen und Bakterien gefunden.

Weitere Kupferenzyme werden im Kapitel über enzymatische Hydroxylierungen angeführt.

2.2. Enzymatische Hydroxylierungen

Hydroxylasen sind für unsere Problemstellung besonders interessant. Das eingeführte Sauerstoffatom kann von molekularem Sauerstoff, von Wasser oder von andern sauerstoffhaltigen Verbindungen stammen. Im ersten Fall gehört das Enzym, nach der Definition von Hayaishi [6], zur Klasse der Oxygenasen.

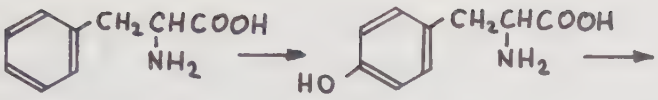
Enzyme, die die allgemeine Reaktion (1) katalysieren, wurden von Mason [4] als "mixed function oxidases" und von Hayaishi [6] als "monooxygenases" bezeichnet.

(1) $S + O_2 + DH_2 \longrightarrow SO + D + H_2O$

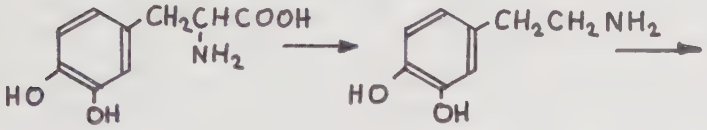
S bedeutet hier Substrat und DH_2 Elektronen- bzw. Wasserstoffdonator. Gehören sowohl S wie auch DH_2 dem gleichen Molekül an, so spricht man von interner, andernfalls von externer Monooxygenase. Der Begriff Monooxygenase rührt daher, dass nur ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Substrat eingebaut wird. Das Enzym hat zwei Funktionen, indem es einerseits Sauerstoff in das Substrat einführt und andererseits DH_2 oxydiert (mischfunktionelle Oxydase).

Die Biosynthese von Norepinephrin (Noradrenalin) zum Beispiel enthält drei, auf Seite 5 dargestellte, Hydroxylierungsschritte.

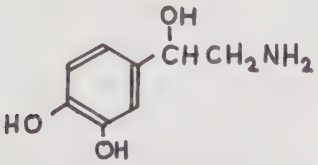
Beim ersten Schritt, der durch Leberenzyme (Phenylalaninhydroxylase) katalysiert wird, dient der Kofaktor (Kosubstrat) Tetrahydrobiopterin, ein Pteridinderivat, als Wasserstoffüberträger, welcher seinerseits wieder von der reduzierten Form des stöchiometrisch verbrauchten Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphats (NADPH) reduziert wird. Ueber die Rolle von allfällig beteiligten Metallionen weiss man noch nichts [12].



Phenylalanin Tyrosin



DOPA Dopamin



Nor-Epinephrin

Das Enzym Tyrosinase, das für den zweiten Schritt verantwortlich ist, hat zudem die Fähigkeit das Produkt (DOPA) zum entsprechenden Chinon zu oxydieren. Dabei dient DOPA als H-Donator. Die spontane Weiterreaktion von Dopachinon führt zum bekannten braunschwarzen Melanin [13]. Für den Fall der Nor-Epinephrin-Biosynthese muss allerdings ein externer H-Donator vorhanden sein. Tyrosinase hydroxyliert auch andere Phenole in ortho-Stellung zu schon vorhandenen Phenolgruppen und o-Diphenole zu Chinonen. Wegen der fehlenden Substratspezifität wird sie auch Polyphenoloxydase, Phenolasekomplex oder Catecholase genannt. Nach Mason und Kertesz ist Tyrosinase ein Cu^{+}-Protein, doch man weiss nicht, in welcher Weise Kupfer aktiv in die eigentliche Oxydationsreaktion eingreift [14].

Durchschaubarer sind die Verhältnisse bei der Hydroxylierung von Dopamin zu Nor-Epinephrin durch die Dopamin-β-hydroxylase. Mit Hilfe von Elektronenspinresonanz-Messungen konnte dieser Mechanismus befriedigend geklärt werden [15]. Die im Enzym enthaltenen zwei Cu^{2+}-Ionen werden durch Ascorbinsäure zur Cu^{+}-Stufe reduziert, wobei Dehydroascorbat entsteht. Das Cu^{+}-Enzym hydroxyliert nun mit einem Molekül Sauerstoff ein Molekül Dopamin, wobei Wasser und das Cu^{2+}-Enzym entstehen. Die allgemeine Gleichung (1) wird also auch hier bestätigt, wobei Kupfer als Elektronenüberträger funktioniert.

Neben den verhältnismässig spezifischen, bei metabolischen Prozessen wirksamen Enzymen sind auch eine Reihe unspezifischer, hydroxylierungsaktiver Enzyme bekannt, die für die sogenannten Entgiftungsreaktionen in den Leberzellenmikrosomen verantwortlich sind. Dabei werden körperfremde Stoffe, z.B. viele Pharmaka, manche Insektizide und krebserzeugende Kohlenwasserstoffe oxydiert und schliesslich im allgemeinen in eine Form überführt, in der sie entweder vom Körper assimiliert oder ausgeschieden werden können. Manchmal hingegen kann die Giftigkeit von Substraten durch diese enzymatischen Reaktionen auch erhöht werden [16]. Es scheint gesichert, dass diese Prozesse im Sinne einer Monooxygenase-Reaktion verlaufen mit einem Häm als prosthetische Gruppe und NADPH als Kosubstrat.

Die zum Beispiel in Meerrettisch reichlich vorkommenden Peroxydasen, eine weitere Klasse von Häm-Enzymen, kann man nur bedingt zu den Monooxygenasen rechnen. Peroxydasen können einerseits Aromaten mit molekularem Sauerstoff hydroxylieren. Dabei dient in vitro z.B. Dihydroxyfumarat als Kosubstrat. Andererseits ist bei der eigentlichen peroxydatischen Reaktion Wasserstoffperoxid der Sauerstofflieferant. Ein wasserstoff- bzw. elektronenlieferndes Kosubstrat wie bei den Monooxygenasen ist in diesem Falle nicht erforderlich [17].

2.3. Nichtenzymatische Hydroxylierungen

Es sind eine Reihe von nichtenzymatischen Hydroxylierungsreaktionen bekannt, die als Modellreaktionen für biologische Oxydationen in Betracht gezogen worden sind. Obwohl diese Modelle die enzymatischen Reaktionen nie exakt simulieren können, bringt doch die Aufklärung der Mechanismen dieser Reaktionen eine erweiterte Kenntnis der Möglichkeiten, die uns bei der Interpretation der biologischen Vorgänge inspirieren kann. Oft können dabei auch irrtümliche Vorstellungen über die Enzyme korrigiert werden.

Am besten bekannt und am meisten studiert ist wohl "Fenton's Reagenz", das aus Fe^{2+}-Ionen und H_2O_2 besteht und Aromaten hydroxylieren kann. Man weiss heute mit Bestimmtheit, dass die angreifende Partikel das freie Hydroxylradikal ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Radikal elektrophilen Charakter hat [18]. Da von manchen Autoren angenommen wurde, dass H_2O_2 oder ein organisches Peroxid als Zwischenstufe der enzymatischen Sauerstoffreduktion auftritt, wurde das Fenton-System sehr genau untersucht. Intermediär auftretende, aromatische Radikale wurden mit Elektronenspinresonanz festgestellt. Die Produktisomerenverteilung wurde studiert und mit andern hydroxylradikalproduzierenden Systemen verglichen.

Das erste nichtenzymatische System, das Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff gestattet, wurde von Udenfriend et al. 1954 gefunden [19,20]. Es besteht aus einer katalytischen Menge des Eisen(II)-Komplexes der Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Ascorbinsäure. In Gegenwart von molekularem Sauerstoff lassen sich, in gepufferter, wässriger Lösung von pH 4 bis 8, verschiedene aromatische Verbindungen zu den entsprechenden Phenolen hydroxylieren. In diesem System kann der molekulare Sauerstoff durch H_2O_2 ersetzt werden. Damit erhält man ein System, das dem Fenton-Reagenz analog ist und bei dem entstehende Fe^{3+}-Ionen

durch Ascorbinsäure laufend reduziert werden. Breslow und Lukens [21] und Grinstead [22] schlossen aus Studien der Isomerenverteilung beim modifizierten Fenton- und beim eigentlichen Udenfriend-System sowie aus Hemmversuchen mit Katalase, dass H_2O_2 ein Zwischenprodukt und dass das Hydroxylradikal die angreifende Spezies sei. Aehnliche Untersuchungen von Norman und Radda [23] und Staudinger und Ullrich [24] ergaben aber Unterschiede bei der Isomerenverteilung bei den beiden Systemen und man ist heute der Ansicht, dass sich die Mechanismen der beiden grundlegend unterscheiden. Ascorbinsäure kann im Udenfriend-System durch andere Endiole, Pyrimidinderivate, Tetrahydropteridine und allgemeine Reduktionsmittel ersetzt werden [25,26]. Selbst Pyridinnucleotide können als Reduktionsmittel gebraucht werden, wenn man zum Beispiel Flavine oder Methylenblau als Elektronen- bzw. Wasserstoffüberträger einsetzt. Andererseits kann der Eisen-EDTA-Komplex durch verschiedene reduzierte Metallionen ersetzt werden [26]. Damit hat es sich gezeigt, dass das ursprüngliche Udenfriend-System nur ein Spezialfall aus einer grossen Reihe hydroxylierender Systeme darstellt, denen allen die Sauerstoffreduktion durch Schwermetallkomplexe gemeinsam ist. Dass es zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus sogar ausgesprochen ungeeignet ist, da es nach mindestens zwei verschiedenen Mechanismen reagiert, haben sowohl Staudinger [26] wie auch Norman [18] festgestellt. Die Anteile der verschiedenen Mechanismen und daher auch die Isomerenverteilung variiert dabei je nach Bedingungen. Ein Mechanismus, der von Hamilton [25] wie auch von Staudinger [26] postuliert wurde, ist eine Zweielektronenreduktion des molekularen Sauerstoff, die nicht zu H_2O_2, sondern nach Spaltung der O-O-Bindung formal zu einem Sauerstoffatom und einem Sauerstoff in der Oxydationsstufe von Wasser führt. Die dabei formal entstehende Spezies "Oxen" ($:\ddot{O}:$), ist einem Carben analog. Carbenanaloge Reaktionen, wie zum Beispiel die Bildung von Cyclohexanol aus Cyclohexan und Cyclohexenoxid aus Cyclohexen bekräftigen

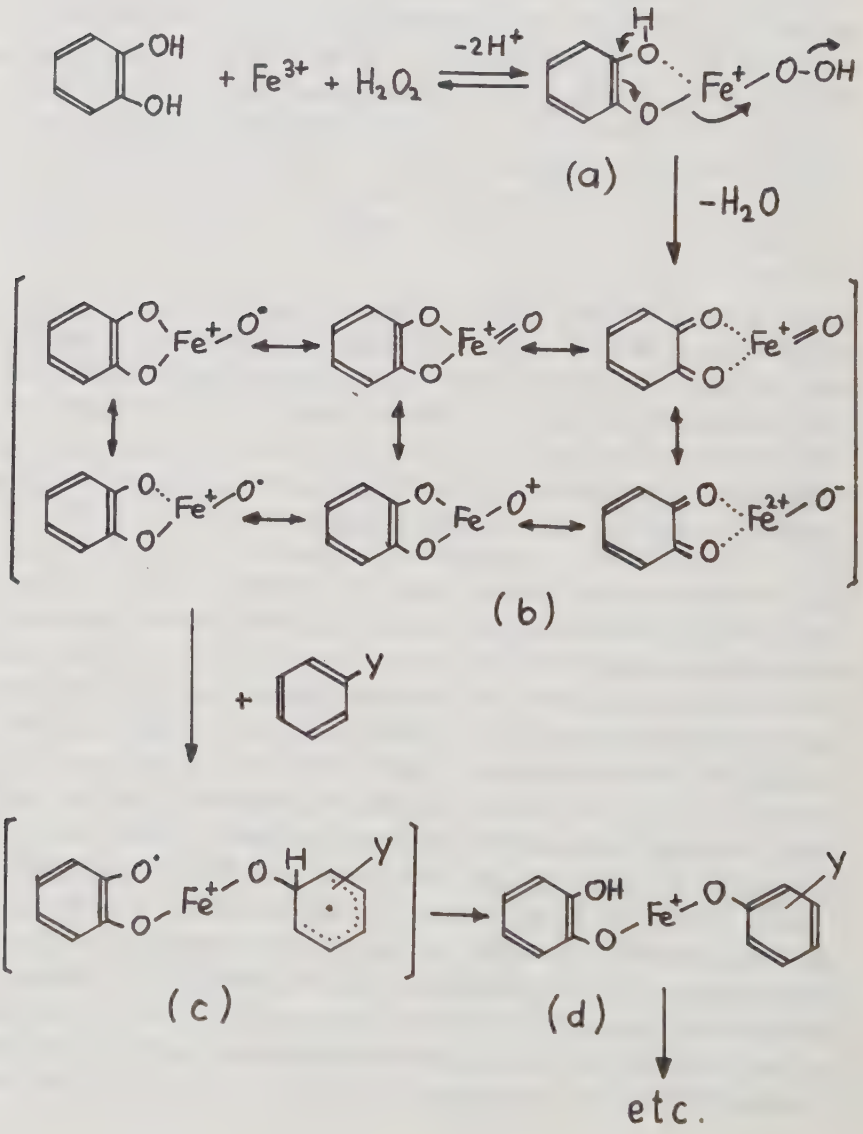
diese Annahme. Es steht dabei allerdings die Frage nach der elektronischen Struktur und die Frage, ob der aktive Sauerstoff am Metallkomplex oder frei reagiert, noch offen. Mehrere Reaktionsfolgen sind beim Oxen-Mechanismus denkbar. Staudinger glaubt mit einem $Sn^{2+}/HPO_4^{2-}/O_2$-System ein Modell gefunden zu haben, das vollständig nach diesem neuen Mechanismus reagiert und dabei die Mason'sche Gleichung für Monooxygenasen erfüllt [26]. Nach Staudinger lässt sich dabei die Gesamtreaktion durch Gleichung (2)

$$(2)\quad Sn^{2+} + O_2 \longrightarrow [SnO_2]^{2+} \xrightarrow{+RH,+H^+} Sn^{4+} + ROH + OH^-$$

Da es in biologischen Systemen aber aus energetischen Gründen unwahrscheinlich ist, dass ein freies Sauerstoffatom entsteht, schlägt Hamilton die Begriffe "Oxenoid-Mechanismus" oder "direkter Sauerstoff-Transfer" vor [27]. Allerdings ist es auch möglich, dass die Zweielektronenreduktion vor der Spaltung der O-O-Bindung erfolgt und somit intermediär eine Peroxidartige Spezies auftritt, bevor das eigentliche Oxenoid entsteht.

Ein von Hamilton 1963 publiziertes System weist teilweise ebenfalls die Charakteristik einer der möglichen Oxenoid-Reaktionsabfolgen auf. Hamilton fand, dass H_2O_2 aromatische Verbindungen hydroxylieren kann, wenn katalytische Mengen von Eisen(III) und Brenzcatechin anwesend sind [28,29,30]. Dabei ist die Bildung von Hydroxylradikalen durch Produktstudien ausgeschlossen worden. Als hydroxylierende Partikel postuliert Hamilton einen resonanzstabilisierten Brenzcatechin-Eisenoxid-Komplex, ähnlich wie ihn George für das Eisen-Porphyrinsystem in der Peroxidase vorgeschlagen hat. Hamilton schlägt für sein System den auf Seite 10 wiedergegebenen Mechanismus vor. Partikel (b) entspricht einem Zwischenprodukt einer der Oxenoid-Reaktionsfolgen [31] und soll analog auch für andere Schwermetallionen denkbar sein. Hamilton verlangt für das Auftreten einer solchen Metalloxidpartikel ein Ligandsystem, das in resonanzstabilisierten, oxydierten und re-

Mechanismus nach Hamilton:



duzierten Formen auftreten kann. Brenzcatechin und Porphyrinsysteme können dies im Gegensatz zu Liganden, die nicht reversibel oxydierbar sind. Anstatt von der Wertigkeit des Eisens, die formal bis zu fünf betragen könnte, spricht man von der Wertigkeit des ganzen Komplexes. Hamilton erzielt mit seinem System Ausbeuten bis zu 50 % bezüglich des verbrauchten H_2O_2. Das System wurde als mögliche Modellreaktion für Peroxydasen und Katalasen betrachtet.

Brackman und Havinga machten 1955 Versuche mit einem System, das als Modell für Tyrosinase betrachtet wurde [32]. Phenol wird durch Cu^{2+}-Ionen, Morpholin und molekularen Sauerstoff zum aminsubstituierten Orthochinonderivat oxydiert. Nur Cu^{2+}-Ionen sind bei dieser Reaktion aktiv. Obwohl das System nicht weiter untersucht wurde, vermutete man die intermediäre Bildung von H_2O_2 und eine Aehnlichkeit mit dem Mechanismus des Hamilton-Systems.

Schwere Isotope von Sauerstoff und Wasserstoff wurden bei der Aufklärung des Mechanismus von Hydroxylasen verwendet. Mason konnte mit $^{18}O_2$- und $H_2{}^{18}O$-Versuchen beweisen, dass der durch Hydroxylasen eingebaute Sauerstoff tatsächlich von molekularem Sauerstoff stammt [4]. Ebenso konnte dies für Modellsysteme nachgewiesen werden. 1967 wurde durch eine Gruppe der "National Institutes of Health" mit dem sogenannten "NIH-Shift" ein sehr interessanter Hinweis auf mögliche Mechanismen gefunden [33]. Als Substrat für enzymatische Hydroxylierungen wurden mit Deuterium und Tritium spezifisch markierte Aromaten verwendet. Es zeigte sich dabei, dass das Wasserstoffatom von der zu substituierenden Stelle in die Nachbarposition wandert und dass das benachbarte H-Atom aus dem Ring austritt. Es liegt also nicht eine klassische, aromatische Substitution vor, sondern eine von intramolekularer Verschiebung begleitete Substitution. Ebenso konnten Chlor- und Bromatome durch Hydroxylierung zur Wanderung gebracht werden. Im Gegensatz zu den Hydroxylasen konnte ein

NIH-Shift weder bei den üblichen aromatischen Substitutionsreaktionen, noch bei den nichtenzymatischen Hydroxylase-Modellen gefunden werden. Untersucht wurden die Bromierung, Nitrierung, Diazokupplung, Friedel-Crafts-Alkylierung und Acylierung wie auch die Systeme von Fenton, Udenfriend und Hamilton. Die Hydroxylierung durch Trifluorperessigsäure zeigt interessanterweise sowohl den NIH-Shift, wie auch, im Gegensatz zu den Oxenoid-Hydroxylierungen, die Produktisomerenverteilung einer elektrophilen, angreifenden Spezies [18,33]. Man schreibt diese Reaktivität der Partikel OH^+, im Prinzip ein protoniertes Oxen, zu. Das Phänomen des NIH-Shifts lässt zwar die bekannten Hydroxylase-Modelle in einem etwas zweifelhaften Licht erscheinen, doch wäre uns damit auch ein Werkzeug gegeben, um neue Systeme auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen.

3. Auswahl und Synthesen der Modellverbindungen

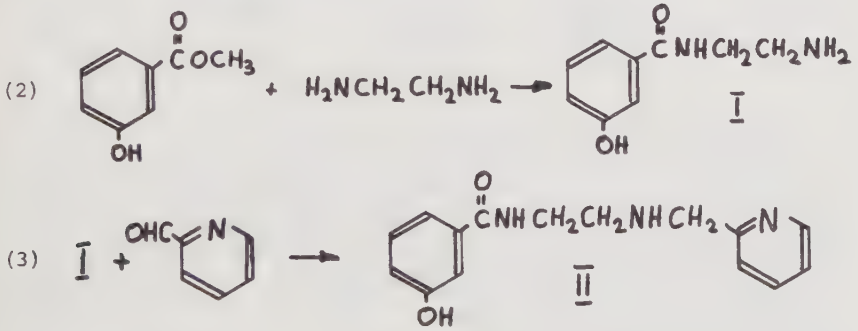
Da für die Untersuchung der allfälligen Hydroxylierungen eine qualitative und quantitative Produktanalyse unumgänglich war, wurden nur Modellsubstanzen in Betracht gezogen, die sich nach erfolgtem Hydroxylierungsversuch leicht in Substrat- und Aktivatorteil spalten liessen. Eine analytische Erfassung der Derivate des gesamten Molekülverbands hätte uns sonst vor praktisch unlösbare Probleme gestellt. Aus diesem Grunde wurden ausschliesslich 3-Hydroxy-benzoesäure- und 3-Hydroxy-benzaldehydderivate hergestellt. Dass der Aktivatorteil seinerseits gegen Angriffe einer aktiven Spezies inert sein sollte, musste ebenfalls vorausgesetzt werden *). Der Aktivatorteil sollte zur Ausbildung von zwei- oder dreizähnigen Chelaten mit dem zu wählenden Metallion befähigt sein.

---

*) vgl. hiezu Kapitel 9

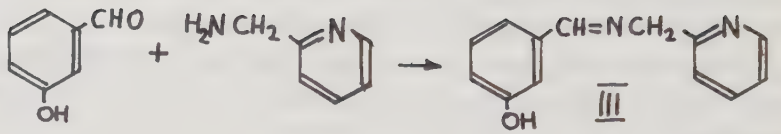
Im folgenden werden die ausgewählten Synthesewege diskutiert. Die Arbeitsvorschriften für die tatsächlich erfolgten Synthesen sind im experimentellen Teil zusammengefasst. Dort finden sich auch die systematischen Bezeichnungen der hergestellten Verbindungen.

Bei Reaktion (2) wurde zur Vermeidung von hohen Anteilen an Disubstitutionsprodukt ein grosser Ueberschuss Aethylendiamin verwendet. Das Entstehen des Cyclisierungsprodukts, eines 4,5-Dihydroimidazolderivats, analog zu Arbeiten von Hill und Aspinall [35] kann durch Optimieren der Reaktionstemperatur reduziert werden. Das Produkt I, das im weiteren C_9-Benzamid genannt wird, stellt eine Modellsubstanz dar.

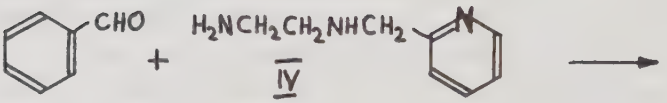


Der in (3) dargestellte Schritt zum C_{15}-Benzamid (II) wurde durch Hydrierung der als Zwischenprodukt gebildeten Schiff'schen Base bei Normaldruck bewerkstelligt. C_{15}-Benzamid war die Modellsubstanz, der ursprünglich unser grösstes Interesse galt.

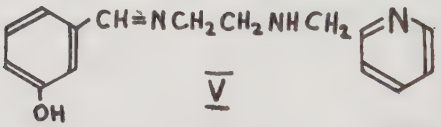
C_{13}-Benzaldimin (III) und C_{15}-Benzaldimin (V) konnten durch einfaches Einwirken des 3-Hydroxybenzaldehyds auf die entsprechenden Amine gewonnen werden. PEN (IV) wurde mir von Herrn dipl. Chem. K.-H. Gerber zur Verfügung gestellt [36].

(4) 

III

(5) 

IV

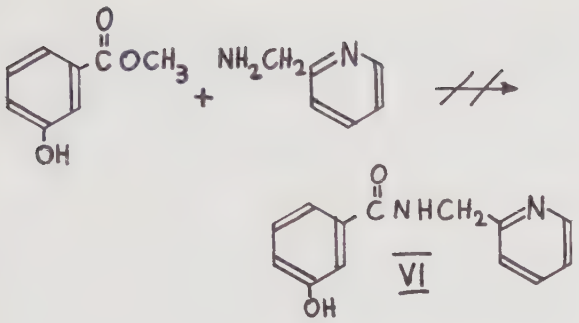


V

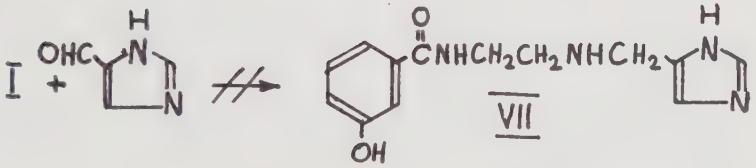
Wie in Reaktion (6) dargestellt, wurde auch versucht, 3-Hydroxy-N-(α-picolyl)-benzamid (VI) analog zu Reaktion (2) herzustellen. Da Disubstitution hier ausgeschlossen war, wurden äquimolare Mengen von Ester und Amin in Alkohol verwendet, doch wurden beim Aufarbeiten jeweils nur die Edukte isoliert.

Ebenfalls scheiterte der Versuch, 3-Hydroxy-N-[2-(4(5)-imidazolyl-methylamino)-äthyl]-benzamid (VII) herzustellen. Der Syntheseversuch (7) analog zu Reaktion (3) führte stets zu einem Produkt, das extrem hygroskopisch und daher nicht exakt zu analysieren war.

(6)



(7)



4. Eigenschaften der Modellverbindungen

Es war für die weiteren Untersuchungen wichtig, zu wissen, unter welchen Bedingungen die Modellsubstanzen hydrolytisch gespaltet werden. C_9-Benzamid (I) und C_{15}-Benzamid (II) waren in wässriger Lösung sehr stabil. Mit heisser konzentrierter NaOH liessen sie sich teilweise, und mit heisser 20-proz. Schwefelsäure quantitativ hydrolysieren. Die zweite Methode wurde dann bei der Analyse der Hydroxylierungsprodukte verwendet. C_{13}-Benzaldimin (III) und C_{15}-Benzaldimin (V) zerfielen sowohl beim Chromatographieren auf Kieselgelplatten, wie auch in wässriger Lösung ziemlich leicht in Amin und Aldehyd. Beim Chromatographieren auf Celluloseplatten wurden sie hingegen nicht gespalten. Obwohl die Benzaldimine mit einer derart geringen Zerfallsstabilität nicht den Vorstellungen über eine ideale Modellsubstanz entsprachen, wur-

den sie doch zu den gleichen Hydroxylierungsversuchen wie die Benzamide verwendet. In wässriger Lösung hatte man dabei stets mit einem unbestimmten, bei Metallkomplexbildung wahrscheinlich etwas niedrigeren Anteil an Aldehyd und Amin zu rechnen, die mit der entsprechenden Schiff'schen Base im Gleichgewicht standen.

Um abzuklären, welches Metallion als Komplexpartner bei den Hydroxylierungsversuchen verwendet werden sollte, wurden die Komplexbildungseigenschaften der Modellverbindungen anhand von Vorversuchen abgeschätzt. Eine exakte Untersuchung von Stabilität und Kinetik der Bildung der Metall-Modellsubstanz-Komplexe wäre erst sinnvoll gewesen, wenn sich die Komplexe zu brauchbaren Hydroxylierungsmodellen verwenden liessen. Ob dies der Fall ist, konnte erst anhand der Analysen der Hydroxylierungsprodukte entschieden werden.

Von C_{15}-Benzamid-dihydrochlorid wurden Neutralisationskurven mit NaOH allein oder mit Zusatz von Cu^{2+}, Fe^{2+} oder Co^{2+} aufgenommen. Durch Vergleich der Kurvenverläufe konnte angenommen werden, dass mit Fe^{2+} und Co^{2+} nur sehr schwache Komplexbildung eintrat, und dass die mit Cu^{2+} sonst häufig beobachtete Abspaltung des Amidprotons im sauren bis neutralen pH-Bereich hier offenbar nicht eintritt. Cu^{2+} wurde somit durch C_{15}-Benzamid wahrscheinlich in einem zweizähnigen Chelatkomplex gebunden, wobei schon bei pH 4 bis 5 zwei Protonen abdissoziierten. Sowohl mit 50 % wie auch mit 100 % Cu^{2+}-Zusatz vermochte C_{15}-Benzamid Cu^{2+} noch bei pH 10 in Lösung zu halten. Dagegen fiel mit Fe^{2+} und mit Co^{2+} das Hydroxid aus. Die unter Stickstoff- und unter Sauerstoffspülung aufgenommenen Neutralisationskurven waren identisch. Mit Co^{2+} unter Sauerstoffspülung wurde hingegen beim Titrieren eine bräunliche Verfärbung festgestellt, die möglicherweise auf eine Autoxydation des Co^{2+} zurückzuführen ist. Mit Hilfe der Job'schen Methode [37] prüften wir, ob bei pH 4,4 mononukleare

1:1-Komplexe von Cu^{2+} mit C_{15}-Benzamid vorliegen. Da sich das Absorptionsmaximum in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses von 640 bis 740 nm verschob, war die Methode leider nicht schlüssig. Das heisst, es muss bei pH 4,4 nebst hydratisiertem Cu^{2+} mehr als eine absorbierende Partikel vorliegen.

C_9-Benzamid zeigte selbst mit Cu^{2+} schlechte Komplexbildungseigenschaften. Eine Intensivierung der blauen Farbe der Cu^{2+}-Lösung konnte bei Ligandzugabe nicht beobachtet werden, zudem fiel sowohl bei 50 % wie auch bei 100 % Cu^{2+}-Zugabe bei pH 5 bis 6 das Hydroxid aus.

Bei PEN und Picolylamin - die nicht als Modellverbindungen in Frage kamen - zeigten die Neutralisationskurven und Absorptionen mit und ohne Cu^{2+}-Zusatz, dass sie zur Ausbildung von stabilen Chelatkomplexen befähigt sind. Insbesondere PEN, das von Gerber [36] als Co^{2+}-Komplex untersucht wurde, zeigte mit Cu^{2+} starke Komplexbildung.

Da C_{13}-Benzaldimin und C_{15}-Benzaldimin hydrolysenempfindlich waren, war eine Beurteilung der Komplexbildungseigenschaften äusserst schwierig. Von beiden Benzaldiminen wurden mit oder ohne Cu^{2+}-Zusatz Neutralisationskurven mit NaOH aufgenommen, wobei kurz vor der Titration berechnete Aequivalente HCl zugegeben wurden. Die Kurven waren ähnlich, aber nicht identisch mit denjenigen von Picolylamin bzw. PEN. Ebenso deutete die intensivierte Blaufärbung auf Chelatbildung. Es war jedoch unmöglich zu sagen, zu welchen Anteilen die Phänomene auf die Benzaldimine bzw. auf die freien Amine zurückzuführen sind. C_{13}-Benzaldimin zeigte wie auch Picolylamin in Anwesenheit von Cu^{2+}-Ionen eine Reaktivität gegen Luftsauerstoff, auf die im Kapitel 9 näher eingegangen wird.

5. Wahl der Bedingungen für die Hydroxylierungsversuche

Aufgrund der Vorversuche wählten wir Cu^{2+} als Schwermetallion für alle unsere Hydroxylierungsversuche, da nur Cu^{2+} einigermassen stabile Komplexe mit dem uns am meisten interessierenden C_{15}-Benzamid bildete. Nach unseren Ueberlegungen waren nur durch eine gute Komplexbildung die Voraussetzungen für eine mögliche Wirkungsspezifität in unserem Sinne gegeben.

Wasserstoffperoxid wurde als Sauerstofflieferant gewählt. Damit stellten sich unsere Versuche allerdings zwangsläufig in Analogie zu den Peroxydasen und Katàlasen. Die Wahl von H_2O_2 ergab sich daraus, dass ausser C_{13}-Benzaldimin keine der möglichen Modellsubstanzen mit Cu^{2+} gegen molekularen Sauerstoff eine Reaktivität zeigte. Beim C_{13}-Benzaldimin ist die Reaktivität zudem nicht nur auf Hydroxylierung zurückzuführen, wie dies spätere Versuche noch zeigen sollten. Die fehlende Hydroxylierungsaktivität mit O_2 ist weiter auch nicht verwunderlich, wenn man sich die Mason'sche Gleichung (1) für mischfunktionelle Oxydasen in Erin-

(1) $S + O_2 \quad DH_2 \longrightarrow SO + D + H_2O$

nerung ruft. In einem System Modellverbindung / Cu^{2+} / O_2 fehlt ja der Elektronen- bzw. Wasserstoffdonator. Ein Versuch, bei dem zusätzlich eine äquivalente Menge Ascorbinsäure zugesetzt wurde, zeigte dann auch die Bildung von hydroxylierten Produkten. Da es dabei aber unklar gewesen wäre, ob eine aktive Spezies tatsächlich am Aktivatorteil und nicht etwa an der Ascorbinsäure gebunden ist (man denke an die Versuche von Udenfriend [19,20]), verzichteten wir auf weitere Versuche dieser Art.

In sämtlichen Hydroxylierungsversuchen wurde das Verhältnis Modellverbindung:Cu^{2+} = 1:1 gewählt und es wurden 4,4 Aequivalente H_2O_2 zugegeben.

Die Hydroxylierungsversuche, die zur Produktanalyse dienen sollten, wurden bei konstantem pH durchgeführt. Durch Zugabe von NaOH wurde das pH entweder auf 5,00 oder auf 9,50 einigermassen konstant gehalten.

Die Versuche dauerten meist 15-24 Stunden und wurden anschliessend durch saure Hydrolyse unterbrochen.

6. Methoden zur Auswertung von Hydroxylierungsversuchen

6.1. Saure Hydrolyse und Dünnschichtchromatographie

Unser wichtigstes Ziel war vorab die Aufklärung der Isomerenverteilung bei den Produkten der verschiedenen Hydroxylierungsversuche. Dazu musste der Substratteil vom Aktivatorteil getrennt werden. Der Aktivatorteil wurde dabei nicht aufgearbeitet. Sowohl im Fall der Benzoesäure- wie auch der Benzaldehydderivate wurde die Isolierung, wie im experimentellen Teil beschrieben, durch saure Hydrolyse und anschliessende Extraktion mit Aether erreicht.

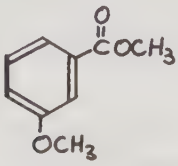
Die zu erwartenden Hydroxybenzoesäuren und besonders die Hydroxybenzaldehyde konnten durch Dünnschichtchromatographie nur unbefriedigend getrennt werden, obwohl in der Literatur eine Anzahl von Trenn- und Nachweismethoden zu finden sind [38]. Etliche Fliessmittel und Nachweismethoden wurden ausprobiert und die brauchbarsten davon zur groben Abschätzung der Versuchserfolge herangezogen. Die Dünnschichtmethode konnte auch darum nicht befriedigen, weil die Erfassungsgrenzen der verschiedenen Isomeren sehr unterschiedlich waren und eine quantitative Analyse somit auf diesem Wege nicht realisierbar war. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind im experimentellen Teil beschrieben.

6.2. Methylierung und Gaschromatographie

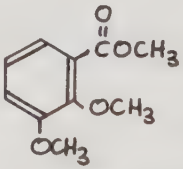
Für die weitaus befriedigerenden gaschromatographischen Analysen mussten die Isomerengemische allerdings zuerst in besser flüchtige Form übergeführt werden. Dies geschah durch Methylierung der Säure- wie auch der Phenolgruppen der durch saure Hydrolyse erhaltenen Produkte mit Dimethylsulfat und K_2CO_3 in Aceton [39].

Die technischen Daten des Gaschromatographen und nähere Angaben über die verwendeten Säulen und Zusatzgeräte finden sich im experimentellen Teil.

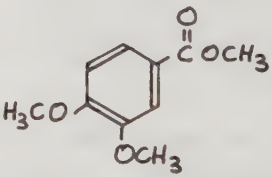
Die zu Vergleichszwecken erforderlichen Benzoesäurederivate wurden aus den entsprechenden Hydroxybenzoesäuren durch Methylierung gewonnen. Von den in Frage kommenden Trihydroxybenzoesäuren hatte ich leider nur Gallussäure als Referenz zur Verfügung. Die dargestellten Verbindungen konnten auf dem Gaschromatographen sauber getrennt werden.



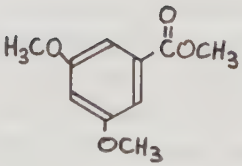
3-



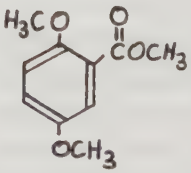
2,3-



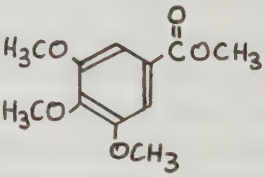
3,4-



3,5-

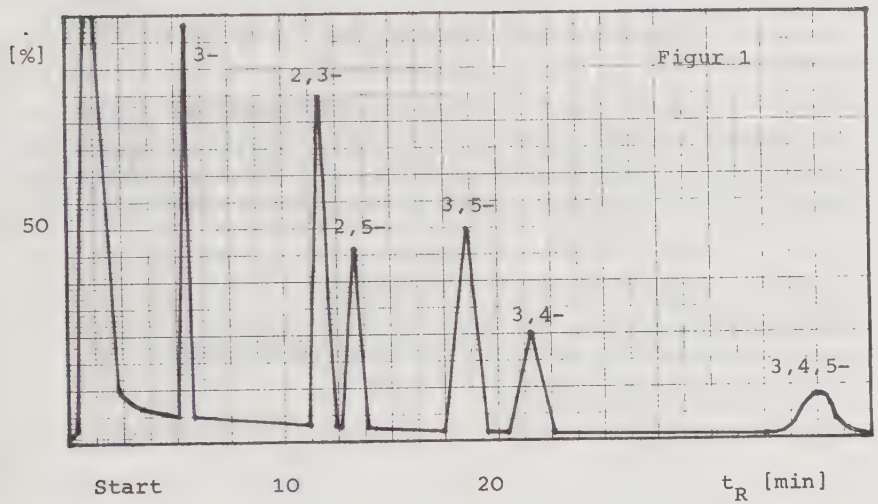


2,5-



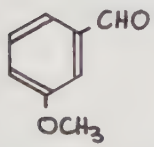
3,4,5-

Figur 1 zeigt die Auftrennung eines solchen Gemisches.

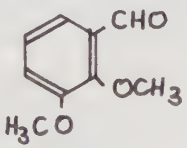


Figur 1

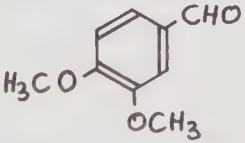
Ebenso wurden im Gaschromatographen die hier gezeigten, käuflichen Methoxybenzaldehyde getrennt.



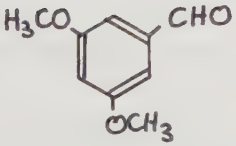
3-



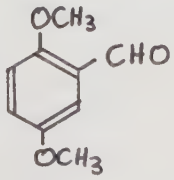
2,3-



3,4-

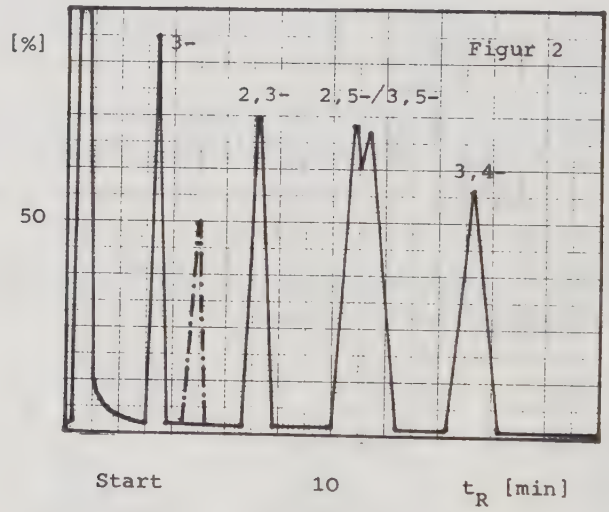


3,5-



2,5-

Lediglich 3,5- und 2,5-Dimethoxybenzaldehyd liessen sich nicht hinreichend trennen. Zur Identifizierung einer der beiden Substanzen müsste hier zum Gemisch vergleichsweise eine der beiden Referenzsubstanzen beigemischt werden. Nur wenn man beide Isomeren nebeneinander quantitativ bestimmen müsste, wäre die Methode nicht brauchbar. Hingegen liess sich 3-Methoxy-benzoesäuremethylester (gestrichelte Linie) einwandfrei im Gemisch identifizieren.



Figur 2

Die qualitative Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten von Analysenpeaks und Referenzsubstanzenpeaks. Bei Unklarheiten wurde die entsprechende Referenzsubstanz als interner Standard beigemischt. Da ein Zweisäulengerät mit Flammenionisationsdetektoren (FID) verwendet wurde, hatten wir einen sehr grossen, linearen Empfindlichkeitsbereich und eine sehr kleine Ansprechgrenze.

Die quantitative Auswertung geschah durch Integration der Peakfläche im geschriebenen Differentialchromatogramm. Dabei musste

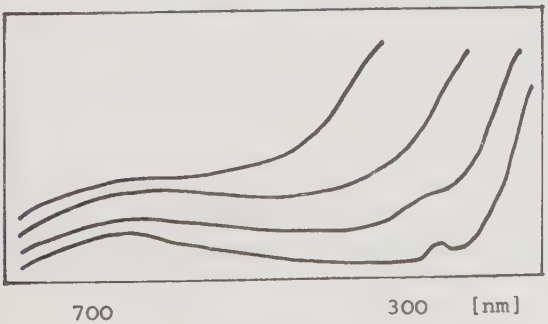
ein angenäherter Detektorfaktor nach der Gleichung

$$f = \frac{\text{Molgewicht}}{\text{Anzahl C-Atome x 12}}$$

berücksichtigt werden. Die Integration erfolgte bei einigermassen idealen Peaks nach dem Cremer-Näherungsverfahren, bei dem die Peakhöhe mit der Breite in halber Höhe multipliziert wird. Peaks mit "tailing" mussten wir nach dem Condal-Bosch-Verfahren annähern. Aufsetzer und Peaks mit Ueberschneidungen wurden durch Zerlegen in Dreiecke und Trapeze ausgewertet. Die Verfahren und ihre Vor- und Nachteile wurden durch Kaiser [40] beschrieben.

6.3. Elektronenspektren

Bei verschiedenen der Hydroxylierungsversuche wurden in zeitlichen Abständen Elektronenspektren aufgenommen. Drei Tatsachen liessen uns diese Messungen allerdings bald als zwecklos erscheinen. Bei den meisten Versuchen entstand nach dem Zugeben von H_2O_2 allmählich ein Niederschlag. Ebenso erfolgte vielfach eine ziemlich heftige Gasentwicklung. Die reinen Cu-Ligand-Spektren zeigten Maxima im Bereich über 600 nm und um 300 nm. Bei H_2O_2-Zugabe nahm die Absorption zuerst im kurzweiligen und später im langwelligen Bereich rapid zu, ohne dass eine deutliche Intensitätsänderung eines diskreten Peaks oder gar isosbestische Punkte beobachtet werden konnten.



Figur 3

6.4. pH-Messungen

Beim Zugeben von H_2O_2 zeigten manche Cu^{2+}-Ligandsysteme eine sofort einsetzende und bis zu Stunden und Tagen dauernde pH-Abnahme. Deshalb wurden die Versuche bei konstantem pH mit Zudosieren von NaOH durchgeführt. Aus dem Verlauf des Basenverbrauchs konnten aber auch keine Schlüsse auf den Reaktionsverlauf gezogen werden, da der Verbrauch wahrscheinlich von mehreren Faktoren abhängt und dessen Gründe völlig ungeklärt sind.

6.5. Messung der Sauerstoffkonzentration

Die Hydroxylierungsversuche laufen gleichermassen unter Stickstoff wie unter Sauerstoff ab. Dies ist weiter nicht verwunderlich, da ein offensichtlicher katalatischer Effekt der Cu^{2+}-Ligand-Systeme existiert und ein Teil des H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert wird. Die Messung des entstehenden Sauerstoffs zur Abklärung des Anteils an katalatischer Reaktion zusammen mit der Bestimmung der H_2O_2-Konzentration scheint zwar auf den ersten Blick die Erfassung der reinen peroxydatischen Reaktion zu ermöglichen. Es ist dazu aber zu bedenken, dass nach der nachweisbaren Entstehung von ortho-Diphenolderivaten diese als Wasserstoffdonatoren im Sinne einer Monooxygenase wie etwa Tyrosinase wirken könnten. Die durch eine solche Reaktion verursachte Aenderung der O_2-Konzentration würde dann unser ganzes Messystem entwerten. Bei den H_2O_2-Versuchen verzichteten wir auf die Messung der Sauerstoffkonzentration.

7. Hydroxylierungsversuche mit Cu^{2+} und H_2O_2

7.1. Allgemeines

Die Hydroxylierungsversuche wurden unter den in Kapitel 5 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und mittels DC und GC ausgewertet. Zusätzliche Details sind in den Kapiteln über die einzelnen Substrate angeführt.

Wahrscheinlich entstanden bei den meisten Hydroxylierungsversuchen Folgeprodukte durch Oxydation oder Kondensation der Substratteile. Zum Teil liessen sich diese nach der Hydrolyse nicht aus der wässrigen Phase extrahieren oder sie schieden während der Aufarbeitung zu methylierten Derivaten aus dem Analysengang aus. Solche und ähnliche dunkelbraun gefärbte Substanzen wurden früher oft als Humine oder Huminsäuren bezeichnet [41]. Wir mussten daher mit einer - zum Teil recht grossen - Dunkelziffer von primär hydroxylierten, aber analytisch nicht mehr erfassbaren Substratteilen rechnen.

Für die quantitative Erfassung zerfällt daher die Menge der Substratteile, abgesehen von methodischen Verlusten, in 4 Gruppen.

1. 3-Hydroxybenzoesäure bzw. -aldehyd
2. Identifizierbare hydroxylierte Produkte
3. Nicht identifizierte, erfassbare Produkte
4. Nicht erfasste Produkte

Die Gruppen 1 bis 3 werden im folgenden prozentual angegeben, bezogen auf die Summe der 3 Gruppen. Die vierte Gruppe konnte in einigen Fällen abgeschätzt werden. Die Prozentangabe ist dabei auf die ursprünglich eingesetzte Menge Ligand bezogen.

Für die gaschromatographischen Analysenresultate wurde eine Kurzschreibweise für die Referenzverbindungen eingeführt. (3), (2,3), (3,4,5) usw. bedeuten in diesen Positionen Methoxy-sub-

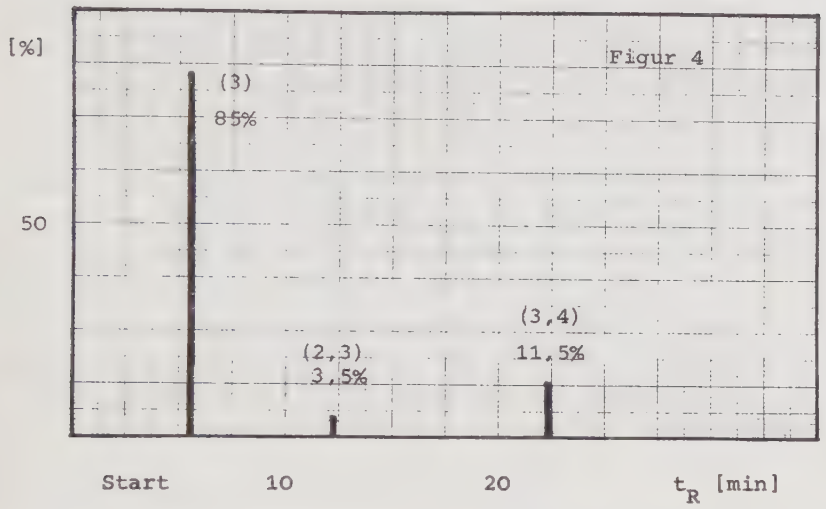
stituierte Benzoesäure-methylesterderivate. Mit (3a), (2,3a) usw. sind die entsprechenden Benzaldehydderivate gemeint und mit X1, X2 usw. bezeichneten wir unidentifizierte Substanzen mit klar erkenntlichen Peaks im GC. In einigen Fällen sind Gaschromatogramme schematisch dargestellt. Die in Ordinatenrichtung angegebenen Prozentzahlen beziehen sich nur auf die gaschromatographisch erfassten Substanzen. Abszisse ist die Retentionszeit (t_R).

7.2. C_{15}-Benzamid

C_{15}-Benzamid zeigte bei pH > 3 eine deutliche Reaktivität gegen H_2O_2 in Gegenwart von äquivalenten Mengen Cu^{2+}. Diese manifestierte sich darin, dass der anfänglich tiefblaue Komplex sich zuerst grün und schliesslich braun verfärbte, wobei sich eine braune Trübung bildete. Zudem entwickelte sich Sauerstoff. Dies deutet auf eine katalatische Nebenreaktion. Das pH sank dabei während Stunden, je nach Konzentration, unter einen Wert von 2.5. Analoge Versuche zeigten, dass 3-Hydroxy-benzoesäure eine ähnliche und PEN überhaupt keine Reaktivität zeigten.

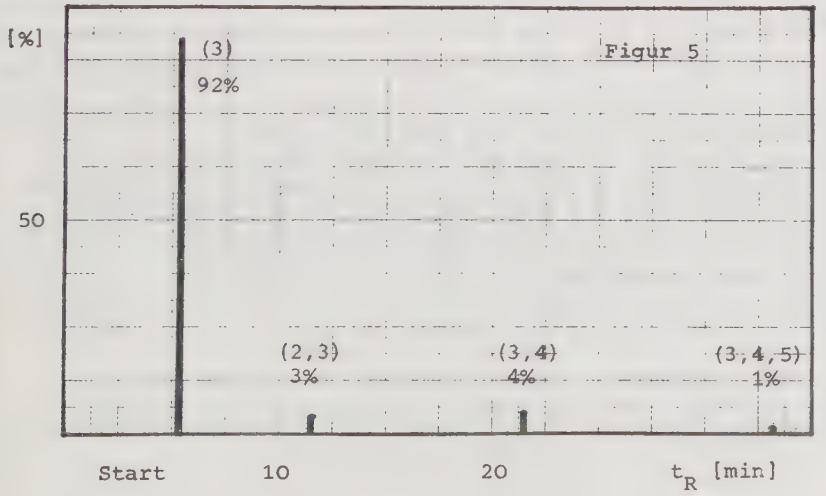
Die GC-Analysen ergaben, dass eine Hydroxylierung teilweise stattgefunden hatte. Figur 4 und 5 zeigen die GC-Resultate in schematischer Form. Das Auftreten von 85 bzw. 92 % (3) bedeutet, dass ein grosser Anteil Edukt unverändert blieb. Die Hydroxylierung ist unspezifisch und die Identifikation des Trimethoxyderivats als Gallussäurederivat ist infolge Fehlens weiterer Referenzsubstanzen nicht gesichert. Der Anteil der durch GC nicht erfassten Produktmenge dürfte 30 - 40 % betragen.

Versuch bei pH 5.00



Figur 4

Versuch bei pH 9.50



Figur 5

7.3. C_9-Benzamid

Unter den gleichen Bedingungen wie bei 7.2. wurden auch mit C_9-Benzamid zwei Versuche durchgeführt, ungeachtet dessen, dass beim pH 9.50-Versuch Kupferhydroxid ausfiel.

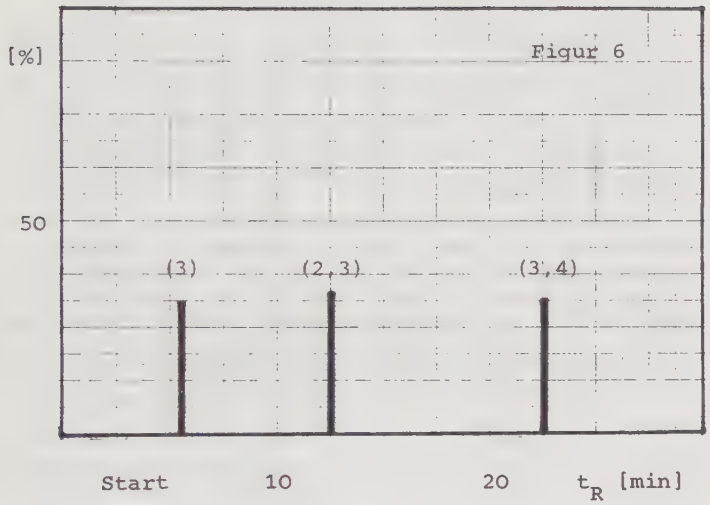
Bei pH 5.00 wurde eine ähnliche zunehmende Braunfärbung wie mit C_{15}-Benzamid festgestellt. Die GC-Analyse zeigte, dass eine Hydroxylierung in 4-Stellung stattgefunden hatte. Wir stellten 90 % (3) und 10 % (3,4) sowie eventuell minime Spuren von (2,3) fest. (3,4,5) wurde nicht gefunden jedoch konnten etwa 45 % der Substratteile gaschromatographisch nicht erfasst werden. Beim pH 9.50-Versuch war ausser (3) im GC nichts festzustellen, was zeigt, dass offenbar nur der Komplex hydroxylierbar ist; wie bereits erwähnt, fiel bei pH 9.50 Cu^{2+} als Hydroxid aus.

7.4. 3-Hydroxy-benzoesäure

Obwohl die Säure keine Modellverbindung darstellt, wurden Versuche zu Vergleichszwecken unternommen.

Beim pH 5.00-Versuch zeigten sich dabei ähnliche, aber heftigere Phänomene von Verfärbung, pH-Aenderung und Sauerstoffentwicklung wie mit C_{15}-Benzamid. Die GC-Analyse (Figur 6) zeigte, dass die Hydroxylierung ungefähr gleichermassen in 2- wie in 4-Stellung stattgefunden hatte. Der hohe Anteil, ungefähr 90 - 95 %, an nicht erfassbaren Reaktionsprodukten und der verhältnismässig geringe Anteil an (3) zeigen uns, dass hier die Hydroxylierung und insbesondere die Bildung von Folgeprodukten recht stark waren. Leider lassen uns sowohl GC wie DC über die Natur dieser Folgeprodukte im unklaren.

Beim pH 9.50-Versuch fiel Kupferhydroxid aus und wir konnten praktisch reine (3) nachweisen, das heisst, auch in diesem Fall ist offenbar nur der Komplex hydroxylierbar.



7.5. 3-Hydroxy-benzoesäuremethylester

Auch diese Versuche wurden nur zu Vergleichszwecken durchgeführt. Obwohl leichte Verfärbung, Trübung und geringe Sauerstoffentwicklung festgestellt wurde, konnte mit unseren Methoden nur das unveränderte Edukt nachgewiesen werden.

7.6. C_{15}-Benzaldimin

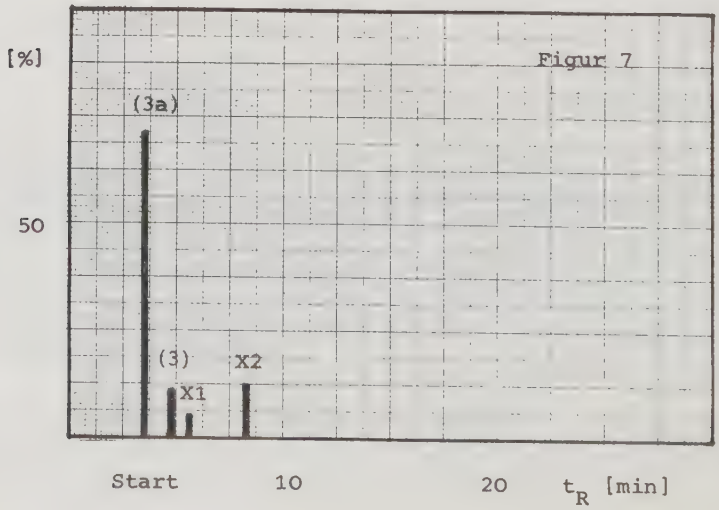
Obwohl, wie schon erwähnt, die Imine instabil waren, wurden mit ihnen Hydroxylierungsversuche unter den gleichen Bedingungen wie bei den Benzamiden durchgeführt. Man hoffte einerseits, dass im Kupferkomplex das Gleichgewicht mehr auf der Seite der Imine liegt und andererseits durch die Koordination des Cu^{2+}-Ions an den Iminstickstoff in unmittelbarer Nähe des Benzolrings eine ausgeprägte Spezifität erreicht würde.

Beim pH 5.00-Versuch ergab sich eine langsame, Stunden dauernde und bei pH 9.50 eine rasche Farbänderung von blau gegen grün. Hingegen wurde keine Sauerstoffentwicklung und praktisch keine pH-Aenderung festgestellt. Unter den gleichen Bedingungen blieb PEN während Tagen unverändert.

Es wurden zwei Versuche bei pH 5.00 durchgeführt. Der erste dauerte 13, der zweite 24 Stunden. Neben (3a) und (3) wurden in beiden Versuchen unbekannte, im GC charakteristische Substanzen gefunden. In den Diagrammen (Figur 7 und 8) werden sie mit X1 bis X5 bezeichnet. Die Menge der durch GC nicht erfassten Produkte ist schlecht abschätzbar. Der Vergleich der beiden Diagramme zeigt, dass die Produktverteilung von der Reaktionszeit abhängt.

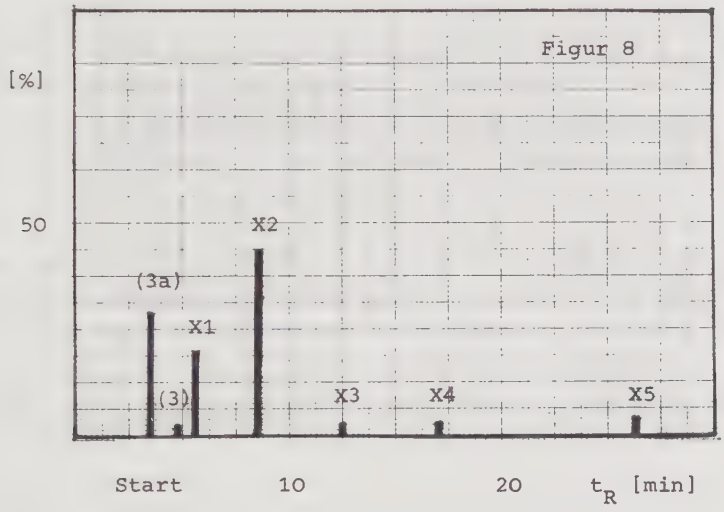
Die GC-Analyse des Versuchs bei pH 9.50 ergab 86 % (3a) und 14 % (3), wobei praktisch die gesamte Produktmenge gaschromatographisch erfasst werden konnte.

Versuch bei pH 5.00 nach 13 Stunden



Figur 7

Versuch bei pH 5.00 nach 24 Stunden



7.7. C_{13}-Benzaldimin

Sowohl im pH 5.00- wie auch im pH 9.50-Versuch wurde Sauerstoff entwickelt und es musste zur Konstanthaltung des pH NaOH zudosiert werden. Bei pH 5.00 verfärbte sich die ursprünglich tiefblaue Lösung dunkelgrün und bei pH 9.50 dunkelbraun.

Trotzdem konnte keine Hydroxylierung festgestellt werden. Die GC-Analyse ergab in beiden Fällen eine Verteilung von 90 % (3a) und 10 % (3). Beim pH 5.00-Versuch wurden die Produkte schätzungsweise vollständig, beim pH 9.50-Versuch jedoch zu etwas weniger als 50 % vom GC erfasst.

7.8. 3-Hydroxy-benzaldehyd

Weder der Versuch bei pH 5.00 noch derjenige bei 9.50 ergaben eine feststellbare Hydroxylierung.

Bei pH 5.00 musste relativ viel NaOH zudosiert werden und es trat rasch Braunfärbung und Trübung ein. Neben Spuren von (3) wurde in der GC-Analyse nur (3a) festgestellt.

Beim pH 9.50-Versuch, wo ein Kupferhydroxidniederschlag auftrat, erfolgte rasche Braunfärbung mit Sauerstoffentwicklung, praktisch ohne dass NaOH zudosiert werden musste. Hier fanden wir in der GC-Analyse neben ungefähr 2.5 % (3) nur (3a). Bei beiden Versuchen wurden die von der GC erfassten Anteile auf über 90 % geschätzt.

8. Andere Hydroxylierungsversuche

8.1. Hydroxylierungsaktivität mit Co^{2+}

3-Hydroxy-benzoesäure wurde bei pH 5.00 mit aequimolaren Mengen Co^{2+} statt Cu^{2+} und 4.4 Aequivalenten H_2O_2 versetzt. Die Rosafärbung der Lösung blieb 17 Stunden unverändert und die Analyse ergab DC- und GC-reine 3-Hydroxy-benzoesäure. Co^{2+} kann also Cu^{2+} in diesem Hydroxylierungssystem nicht ersetzen.

8.2. Ascorbinsäure als Wasserstoffdonator

Es wurde ein Versuch mit C_{15}-Benzamid, Cu^{2+} und - und im Gegensatz zu allen übrigen Hydroxylierungsversuchen - mit Ascorbinsäure und Luftsauerstoff an Stelle von H_2O_2 durchgeführt.

C_{15}-Benzamid, $CuSO_4$ und Ascorbinsäure wurden in aequimolaren Mengen eingesetzt. Die tiefblaue Lösung verfärbte sich während

der Reaktion grün. Nach 20 Stunden wurden die Produkte hydrolysiert, extrahiert und mit DC (Fliessmittel a *) analysiert. Neben 3-Hydroxy- und 3,4-Dihydroxy-benzoesäure konnten noch zwei unbekannte Produkte festgestellt werden. Dieses Resultat lässt uns vermuten, dass unser "System" in Anwesenheit eines Reduktionsmittels wie Ascorbinsäure auch im Sinne einer Monooxygenase funktionieren könnte.

9. Oxydationsversuche mit C_{13}-Benzaldimin und Picolylamin; Oxydationsempfindlichkeit anderer Verbindungen

9.1. C_{13}-Benzaldimin

Wie schon in Kapitel 5 erwähnt, zeigte C_{13}-Benzaldimin mit Cu^{2+} eine Reaktivität gegenüber Sauerstoff. Diese Reaktivität ist im Sinne einer Monooxygenase nicht verständlich, weil ein Wasserstoff- bzw. Elektronendonator eigentlich nicht vorliegt, es sei denn, der Aktivatorteil selbst werde oxydiert und gäbe Wasserstoffatome ab. Dies wäre eine analoge Reaktion zu einer internen Monooxygenase. Picolinamid bzw. Picolinsäure wären dann denkbare Produkte.

Bei einem pH von $\geq$ 8 tritt beim C_{13}-Benzaldimin-Cu^{2+}-Komplex eine allmähliche Grünfärbung und schliesslich ein brauner Niederschlag auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit, abgeschätzt anhand der Verfärbung, war bei höherem pH wesentlich grösser. Für die Produktanalyse wurde ein 16-stündiger Versuch bei pH 9 unter Sauerstoffspülung durchgeführt. Dabei blieb das pH ohne besondere Massnahmen einigermassen konstant. Das Gemisch wurde wie üblich aufgearbeitet und der Substratteil mit DC (Fliessmit-

*) Fliessmittelzusammensetzung siehe exp. Teil.

tel d) und GC analysiert. Die GC-Analyse ergab 92 % (3a), 6 % (3) und 2 % (3,4a). Der Anteil der vom GC nicht erfassten Produkte beträgt mindestens 30 %.

Wir stellten also immerhin eine, wenn auch sehr schwache Hydroxylierungsaktivität fest. Das Schicksal des Aktivatorteils (Picolylamin) blieb durch diese Untersuchungen zwar ungeklärt, doch zeigen die in 9.2. beschriebenen Versuche, dass dieser oxydiert worden ist.

Bei diesem Oxydationssystem war eine Verfolgung der Reaktion durch Sauerstoffkonzentrationsmessungen angezeigt. Damit die Reaktionsgeschwindigkeit und daher auch die O_2-Konzentrationsänderung eine einigermassen messbare Grösse erreichten, wurden die Messungen bei pH 12.00 durchgeführt. Nach einer Induktionsperiode von ungefähr 15 - 20 Minuten erfolgte die Sauerstoffabnahme mit einer Halbwertszeit von ungefähr 15 Minuten in annähernd erster Ordnung. Sättigung trat ein, nachdem pro Ligandmolekül ungefähr ein halbes Sauerstoffmolekül aufgenommen war. Durch Ansäuren der reagierten Lösung liess sich der aufgenommene Sauerstoff nicht wieder freisetzen. Wir haben es also hier nicht mit einer reversiblen Oxygenierung zu tun, wie solche im Arbeitskreis von Prof. Fallab für Co^{2+}-Komplexe beschrieben wurden [34].

9.2. Picolylamin

Oxydationsversuche wurden auch mit dem Aktivatorteil allein (Picolylamin) durchgeführt. Analoge Oxygraphversuche mit Picolylamin statt C_{13}-Benzaldimin zeigten praktisch die gleichen Resultate. Diese Tatsache und die geringe Ausbeute an hydroxylierten Produkten zeigten, dass bei der beim C_{13}-Benzaldimin beobachteten Reaktivität offensichtlich eine Oxydation des Aktivatorteils stattfinden musste. Unter diesen Umständen entsprach

also der Aktivatorteil von C_{13}-Benzaldimin nicht den Forderungen für die Inertheit, die wir ursprünglich gestellt hatten.

Wir versuchten die Oxydationsprodukte von Picolylamin zu identifizieren. Picolylamin wurde in Wasser mit einer aequimolaren Menge $CuSO_4$ versetzt und mit NaOH auf pH 12.00 gestellt. Das Gemisch wurde über Nacht mit Sauerstoff gespült und gerührt. Je ein Teil des Reaktionsgemischs wurde dann bei pH 12.00 bzw. 7.00 mit EDTA versetzt und mit einem Benzol-Aether-Gemisch extrahiert. Anhand von DC mit Fliessmitel b und c wurde das Extrakt mit einigen möglichen Oxydationsprodukten, wie z.B. Picolinsäure, Picolinsäureamid (synthetisiert nach Camps [42]) und Picolinaldehyd verglichen. Picolinaldehyd konnte als Oxydationsprodukt ausgeschlossen werden; Picolinsäureamid wurde in kleinen Mengen gefunden; Picolinsäure liess sich mit Extraktion und DC weder nachweisen, noch sicher ausschliessen. Der Hauptteil der im DC gefundenen Produkte war jedoch eine unbekannte Substanz, die auf der Platte bei 366 nm fluoroszierte und mit Schwefelsäure und Fe^{2+} eine intensive blaurote Färbung ergab.

9.3. Oxydationsempfindlichkeit anderer Verbindungen

In der Folge prüften wir weitere in den Hydroxylierungsversuchen untersuchte Verbindungen unter den gleichen Bedingungen wie C_{13}-Benzaldimin und Picolylamin (pH 12.00 / Cu^{2+}) mit dem Oxygraphen. Dabei konnten wir feststellen, dass C_{15}-Benzaldimin und PEN überhaupt keine O_2-Aufnahme zeigten. 3-Hydroxy-benzaldehyd, 3-Hydroxy-benzoesäure und C_{15}-Benzamid zeigten eine sehr schwache, aber messbare Aufnahme von Sauerstoff, während C_9-Benzamid und EN etwa ein Zehntel der Reaktivität von C_{13}-Benzaldimin und Picolylamin zeigten.

10. Diskussion

10.1. Versuche mit Wasserstoffperoxid

Die Verwendung von H_2O_2 stellte unsere Versuche, wie schon in Kapitel 5 erwähnt, in Analogie zu den Peroxydasen und Katalasen. Bei der katalatischen Disproportionierung (8) wird je ein Molekül H_2O_2 oxydiert bzw. reduziert.

(8) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\,H_2O$

Ersetzt man eines der beiden H_2O_2-Moleküle durch ein oxydierbares Substrat, so läuft die peroxydatische Reaktion (9) ab.

(9) H_2O_2 + Substrat $\longrightarrow$ oxydiertes Substrat + H_2O

Die Reaktionen (8) und (9) werden in der Natur durch Katalase bzw. Peroxydase - zwei Fe(III)-porphyrinhaltige Enzyme - katalysiert [46].

10.1.1. Katalatische Reaktion

Unsere Versuche mit H_2O_2 zeigten neben der peroxydatischen Reaktion (9), die uns im Hinblick auf Hydroxylierungen interessierte - in Uebereinstimmung mit den Untersuchungen von Sigel [47] über die katalatische Aktivität von Cu^{2+} und Cu^{2+}-Komplexen - meist auch die katalatische Reaktion (8). In einigen Fällen trat die katalatische Reaktion auch auf, ohne dass gleichzeitig Hydroxylierung stattfand. Im Rahmen unserer Arbeit war die katalatische Reaktion nichts weiter als eine unerwünschte und die Untersuchungen komplizierende Nebenreaktion. Hamilton [29,30] beobachtete hingegen bei seinem Brenzcatechin-Fe^{3+}-System - das uns eigentlich Anregung zur vorliegenden Arbeit war - keine wesentliche katalatische Aktivität.

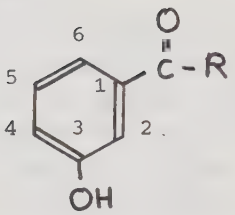
10.1.2. Peroxydatische Reaktion

Durch peroxydatische Reaktionen können bei unseren Modellsubstanzen einerseits Hydroxylierungen des Substratteils auftreten; andererseits ist durch peroxydatische Reaktionen auch eine Oxydation des Aktivatorteils und die Bildung von Folgeprodukten aus hydroxylierten Partikeln denkbar. Da unsere Analysenmethoden nur die Hydroxylierungsprodukte erfassten, kann im folgenden nur das Auftreten solcher Produkte diskutiert werden.

Wenn wir die Ausbeuten an hydroxylierten Produkten im Hamilton-System (bis zu 50 % bezüglich H_2O_2) mit unseren besten Resultaten vergleichen, so sehen wir, dass unsere Ausbeuten wesentlich geringer sind. Zudem liegen unsere Reaktionsgeschwindigkeiten weit unter denjenigen des Hamilton-Systems *). Dies kann daran liegen, dass in unserem System kein mesomeres Zwischenprodukt entstehen kann, wie es Hamilton postuliert (siehe S. 10). Die Tatsache, dass ausser C_{15}-Benzamid auch 3-Hydroxy-benzoesäure - und zwar rascher - hydroxyliert wird, zeigt uns, dass der erhoffte Aktivator-Effekt der stickstoffhaltigen Kette ausgeblieben ist. Da unser "Aktivatorteil" inaktiv war, blieb auch die gewünschte Spezifität aus. Es hat sich gezeigt, dass der ortho-dirigierende Einfluss der schon vorhandenen Phenolgruppe so gross ist, dass der erhoffte sterische Effekt nicht sichtbar wird. Uebrigens werden auch bei der Tyrosinaseaktivität nur Hydroxylierungen in ortho-Stellung zu schon vorhandenen Phenolgruppen beobachtet. Bei einer Aktivierung durch die Seitenkette wäre spezifische Hydroxylierung in 2-Stellung zu erwarten gewesen. Der einzige Effekt, den der Aktivatorteil auf die Isome-

---

*) Ferner ist zu bemerken, dass Hamilton Brenzcatechin und Fe^{3+} in katalytischen Mengen einsetzt, während wir, da Substrat und Aktivator Teile desselben Moleküls sind, ein Verhältnis von 1:1 vorliegen haben.



R = Aktivatorteil oder OCH_3, OH

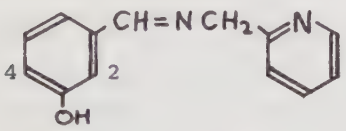
renverteilung der Produkte hatte, war hingegen eine leichte Hemmung der Hydroxylierung in 2-Stellung gegenüber derjenigen in 4-Stellung; vermutlich ein Effekt sterischer Hinderung.

Das Ausbleiben der Hydroxylierung im Falle des 3-Hydroxy-benzaldehydes, der Benzaldimine und des 3-Hydroxy-benzoesäuremethylesters kann nicht eindeutig erklärt werden. Es könnte sein, dass zu einer Hydroxylierungsaktivität eine spezielle Komplexbildung mit Cu^{2+} notwendig ist und diese in den erwähnten Fällen - im Gegensatz zu den Benzamiden und der 3-Hydroxy-benzoesäure - nicht stattfindet. Für die Abklärung solcher Fragen wären Versuche mit weiteren Substraten erforderlich. Da wir es vermutlich teilweise mit labilen, ternären Komplexen zu tun haben, würden solche Untersuchungen ziemlich kompliziert.

10.2. Versuche mit molekularem Sauerstoff

Der in 8.2. beschriebene Versuch, bei dem zur Hydroxylierung von C_{15}-Benzamid Ascorbinsäure und Luftsauerstoff statt Wasserstoffperoxid verwendet wurden, kann - wie schon erwähnt - als Modellreaktion für eine Monooxygenase gedeutet werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste allerdings mit Isotopenversuchen bewiesen werden, dass je ein Atom Sauerstoff in das Substrat eingebaut bzw. zu Wasser reduziert wird [4].

Ein weites Feld für Spekulationen und wenige brauchbare Beweise liegen bei der in Kapitel 9 beschriebenen Oxydation von C_{13}-Benzaldimin und Picolylamin vor. Es wurde schon darauf hingewiesen, dass für die Deutung der C_{13}-Benzaldimin-Oxydation als Monooxygenase der Aktivatorteil (Picolylamin) als Wasserstoff- bzw. Elektronendonator funktionieren müsste. Da im Falle von C_{13}-Benzaldimin, wenn auch in geringem Masse, eine Hydroxylierung in 4-Stellung mit Luftsauerstoff stattgefunden hatte, sei eine spekulative Deutung des Geschehens im folgenden skizziert.



C_{13}-Benzaldimin

Mason [4] nennt die Enzyme, die die Reaktionen (10) und (11) katalysieren, Elektronentransfer-Oxydasen.

(10) $O_2 + 2\,e^- \longrightarrow O_2^{2-}$

(11) $O_2 + 4\,e^- \longrightarrow 2\,O^{-2}$

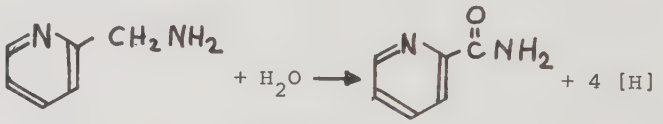
Reaktion (11) kann auch mit "Wasserstoffatomen" formuliert werden (11a).

(11a) $O_2 + 4\,[H] \longrightarrow 2\,H_2O$

Wenn bei solchen Reaktionen das Elektronen- bzw. Wasserstoffdonatormolekül Sauerstoffatome aufnimmt, so stammen diese definitionsgemäss "von Lösungsmittelanionen oder Oxyionen, die im Lösungsmittel gelöst sind".

Die Oxydation von Picolylamin könnte als eine zu Reaktion (11a) parallel verlaufende Reaktion (12) gedeutet werden, da bei un-

seren Untersuchungen Picolinsäureamid zumindest teilweise als Produkt festgestellt wurde.

(12) 

Damit hätten wir bei der C_{13}-Benzaldimin-Oxydation eine den biologischen Elektronentransfer-Oxydationen analoge Reaktion.

Ferner könnte im Falle des Imins die beobachtete Hydroxylierung, analog einer Monooxygenase als Nebenreaktion der "Aktivatorteil"-Oxydation aufgefasst werden. Die in der umgeformten Mason'schen Gleichung (13) erforderlichen Reduktionsäquivalente könnten dabei aus Reaktion (12) stammen.

(13) $SH + O_2 + 2\,[H] \longrightarrow SOH + H_2O$

Ueber die bei einem solchen Reaktionsverlauf auftretenden aktiven Partikel und über dabei mögliche koordinative Verknüpfungen können wir allerdings nichts aussagen. Ebenso bedürften die beobachtete Induktionsperiode und das benötigte stark alkalische Milieu einer Erklärung, die wir hier zu geben nicht imstande sind. Immerhin gibt diese Hypothese einen möglichen Zusammenhang zwischen der Oxydation des Aktivatorteils und der Hydroxylierung des Substratteils von C_{13}-Benzaldimin.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden, wenn nicht anders vermerkt, in der evakuierten und zugeschmolzenen Kapillare im Kupferblock bestimmt und sind korrigiert.

IR-Spektren wurden im Bereich von 625-4000 cm^{-1} mit einem Spektrophotometer Beckman IR-8 und Elektronenspektren auf einem Beckman-Spektrophotometer Modell DB aufgenommen.

Substanzproben zur Elementaranalyse wurden etwa 20 Stunden bei 40° im Hochvakuum getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der Ciba-Geigy Aktiengesellschaft, Basel (Dr. W. Padowetz).

Titrationen wurden mit einem Potentiograph E 436 mit Titrierstand E 436 E und kombinierter Glaselektrode UX der Firma Metrohm, Herisau, mit thermostatisierten Lösungen durchgeführt. Für routinemässige pH-Messungen und Einstellungen bei den Hydroxylierungsversuchen wurde ein Potentiometer E 187 der gleichen Firma verwendet.

Sauerstoffkonzentrationsmessungen wurden an einem Oxygraphen mit Clark-Elektrode (Firma Gilson) mit bei 25° thermostatisierten Lösungen durchgeführt. Als Referenzkonzentration wurde diejenige von luftgesättigtem Wasser bei 25° verwendet, die nach Literatur [43] $2.577 \cdot 10^{-4}$ Mol O_2/Liter beträgt.

Dünnschichtchromatographie

Als Plattenmaterial dienten mit Kieselgel MNG/UV_{254} oder Cellulosepulver MN 300 (Firma Machery & Nagel) beschichtete Normplatten. Es wurde mit folgenden Fliessmittelgemischen bei Raumtemperatur und Kammersättigung chromatographiert:

		Volumenteile
a	Benzol : Dioxan : Eisessig	90 : 25 : 4
b	" Äthanol : 25-proz. Ammoniak	9 : 1
c	Benzol : Dioxan	4 : 1
d	Benzol : Eisessig : Essigester	90 : 5 : 5
e	Benzol : Dioxan : 25-proz. Ammoniak	90 : 25 : 4

Zur universellen Sichtbarmachung wurde ein Gerät (Firma Uvanalys) mit zwei Lampen der Wellenlängen 254 und 366 nm des Instituts für Organische Chemie verwendet.

Der Nachweis von hydroxylierten Benzoesäuren erfolgte im übrigen mit Echtblausalz B (Merck), Paulys Reagenz und 4-proz. $FeCl_3$ in 0.5N HCl nach den Vorschriften von Stahl [38]. Auch wo nicht speziell erwähnt, wurden die synthetisierten Amine mit DC auf Reinheit und Identität geprüft. (Fliessmittel b./UV und Joddämpfe.)

Gaschromatographie

Die Beschreibung der Methode folgt im Kapitel über die Analysen der Hydroxylierungsprodukte.

2. Synthesen der Modellverbindungen

2.1. 3-Hydroxy-N-(2-aminoäthyl)-benzamid (= C_9-Benzamid)

40 g (0.26 Mol) 3-Hydroxybenzoesäuremethylester (Fluka, purum) wurden mit 400 ml (6.7 Mol) Aethylendiamin (BDH, 99 %) 17 Stunden bei 90° gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer vom überschüssigen Amin befreit und in wenig EtOH aufgenommen. Kristallisation ergab 19.5 g. Zur Reinigung wurde in 200 ml absolutem EtOH mit Aktivkohle gekocht, abfiltriert und rekristallisiert: 18.5 g (38 %), Smp. 137°.

IR-Spektrum (KBr-Pille): 1530 cm^{-1} (C=O, Amid)

Titration mit Perchlorsäure ergab ein Aequivalentgewicht von 180, welches dem erwarteten Molekulargewicht - 180.20 - entspricht.

$C_9H_{12}O_2N_2$	Ber.	C 59.98	H 6.71	N 15.55
(180.20)	Gef.	" 59.58	" 6.74	" 15.38

2.2. C_9-Benzamid-Hydrochlorid

2.0 g (11 mMol) C_9-Benzamid wurden in 40 ml EtOH gelöst und mit 10 ml ca. 9.5M alkoholischer HCl versetzt und gekocht. Man erhielt 2.15 g (89 %) kristallines C_9-Benzamid-Hydrochlorid vom Smp. 203°.

$C_9H_{13}O_2N_2Cl$	Ber.	C 49.89	H 6.05	N 12.93	Cl 16.36
(216.67)	Gef.	" 49.66	" 6.35	" 12.83	" 16.50

2.3. 3-Hydroxy-N-2-(α-picolylamino)-äthylbenzamid-dihydrochlorid (= C_{15}-Benzamid·2 HCl)

9 g (50 mMol) C_9-Benzamid und 5.4 g (50 mMol) frisch destillierter Picolinaldehyd (Pyridin-2-aldehyd, Fluka, purum) wurden in 500 ml absolutem EtOH gelöst. Bei der Hydrierung unter Normaldruck mit 750 mg 10 %-Pd auf Aktivkohle (Fluka) wurden in 3 Stunden 1040 ml (theoret. 1120 ml) Wasserstoff verbraucht. Die Lösung wurde auf die Hälfte des Volumens eingeengt und das Produkt mit alkoholischer HCl ausgefällt. Umkristallisieren in absolutem EtOH ergab 11.7 g (68 %) Hydrochlorid vom Smp. 197°.

IR-Spektrum (KBr-Pille) charakterist. Banden: 1140/765/742/697 cm^{-1}.

UV-Spektrum in Wasser: max. 286 nm / 2140 $l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Titration mit NaOH ergab ein Aequivalentgewicht von 344, welches dem erwarteten Molekulargewicht entspricht.

$C_{15}H_{19}O_2N_3Cl_2$	Ber.	C 52.34	H 5.56	N 12.21	Cl 20.60
(344.24)	Gef.	" 52.20	" 5.46	" 12.19	" 20.45

2.4. 3-Hydroxy-N-(α-picolyl)-benzaldimin
(= C_{13}-Benzaldimin)

12.2 g (0.1 Mol) 3-Hydroxybenzaldehyd (Fluka, puriss.) und 10.8 g (0.1 Mol) destilliertes α-Picolylamin (Raschig, Ludwigshafen) wurden in ca. 200 ml absolutem EtOH gelöst und 24 Stunden stehen gelassen. Kristallisation im Kühlschrank ergab 14.2 g (67%) Aldimin vom Smp. 119°.

IR-Spektrum (Paraffin): 1640 cm^{-1} (C=N, Imin)

DC (Kieselgel): Spaltung in Aldehyd und Amin mit sieben verschiedenen Fliessmitteln.

DC (Cellulose): einheitlich mit Fliessmittel e.)

$C_{13}H_{12}ON$	Ber.	C 73.56	H 5.70	N 13.20
(212.24)	Gef.	" 73.11	" 5.83	" 13.03

2.5. N-(α-picolyl)-äthylendiamin (= PEN)

Das freie Amin, sowie das Trinitrat (Smp. 162°) wurden mir von Herrn dipl.chem. K.-H. Gerber [36] zur Verfügung gestellt. Dieser hatte die Substanz nach Hoyer [44] und nach Mäcke [45] synthetisiert.

2.6. 3-Hydroxy-N-2-(α-picolylamino)-äthylbenzaldimin
(= C_{15}-Benzaldimin)

6 g (40 mMol) PEN und 5 g (40 mMol) 3-Hydroxybenzaldehyd (Smp. 103-105°) wurden in ca. 150 ml absolutem Aether zusammengegeben und aufgekocht. Durch zweimaliges Kristallisieren wurden 9 g (88 %) des Benzaldimins gewonnen. Smp. 103°.

Mischschmelzpunkt mit 3-Hydroxybenzaldehyd 60-90°.

IR-Spektrum (Paraffin): charakteristische Banden von Ester und primärem Amin fehlen.

DC (Kieselgel): Spaltung in Aldehyd und PEN in verschiedenen Fliessmitteln.

$C_{15}H_{17}ON_3$	Ber.	C 70.56	H 6.71	N 16.46
(255.31)	Gef.	" 70.58	" 6.68	" 16.25

3. Synthesen der Referenzsubstanzen

Picolinsäureamid

Das Amid wurde aus Picolinsäureäthylester (Fluka, purum) und konzentriertem Ammoniak nach der Vorschrift von Camps [42] hergestellt. Smp. 106° (Koflerblock)

$C_6H_6N_2O$	Ber.	C 59.01	H 4.95	N 22.94
(122.12)	Gef.	" 59.03	" 4.90	" 22.84

Methoxy-benzoesäuremethylester

3-Hydroxy-benzoesäure, 2,3-, 2,5-, 3,4-, 3,5-Dihydroxybenzoesäure (Fluka, Schuchardt) und 3,4,5-Trihydroxy-benzoesäure (Merck) wurden zu den entsprechenden Methoxy-methylestern methyliert. Da die Präparate bekannt sind, wird die Methylierung nur summarisch beschrieben und es wird auf eine Charakterisierung weitgehend verzichtet. Die Mengenangaben in der Beschreibung beziehen sich auf die Monohydroxy-/ Dihydroxy- bzw. Trihydroxysäuren.

Analog einer Vorschrift von Sunderwirth [39] wurden 10 mMol der Säure in wasserfreiem Aceton gelöst und mit 5 g (40 mMol) / 7.5 g (60 mMol) bzw. 10 g (80 mMol) destilliertem Dimethylsulfat (Fluka, puriss. p.a.) und 7 g (50 mMol) / 11.5 g (75 mMol) bzw. 14 g (100 mMol) wasserfreiem Kaliumcarbonat behandelt. Die Re-

aktionsmischung wurde 5 Stunden am Rückfluss gekocht, filtriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedampft und der Rückstand in Aether aufgenommen. Die Aetherlösung wurde mit 2N NaOH und mehrmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Die Ester wurden in hohen Ausbeuten erhalten und ergaben im GC einheitliche Peaks. 3,4,5-Trimethoxy-benzoesäuremethylester zeigte den Smp. 83-85° (Beilstein 84°).

4. Hydroxylierungsversuche

Die Bedingungen der Hydroxylierungsversuche wurden in den Kapiteln 5 und 7 des theoretischen Teils schon "grosso modo" angegeben. Zur Illustration wird hier trotzdem die Durchführung eines Versuchs geschildert, der zur Produktanalyse diente. Alle übrigen Versuche wurden in analoger Weise ausgeführt.

Beispiel: C_{15}-Benzamid mit Cu^{2+} und H_2O_2 bei pH 9.50

344 mg (1 mMol) C_{15}-Benzamid-dihydrochlorid wurden im Becherglas mit einer Lösung von 1 mMol $CuSO_4$ in ca. 10 ml Wasser versetzt. Das Volumen wurde mit H_2O auf ungefähr 50 ml ergänzt und der pH-Wert mit wässriger Natronlauge auf 9.50 eingestellt. Die Reaktion begann mit der Zugabe von 5 ml (4.4 mMol) 3-proz. H_2O_2. Die Reaktionsmischung wurde gerührt und das pH durch Zutropfen von 0.1N NaOH aus einer Bürette manuell konstant gehalten. Nach 21 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 20-proz. H_2SO_4 (Hydrolyse) unterbrochen.

5. Produktanalysen

5.1. Saure Hydrolyse

Im Falle der Benzamide wurde das Hydroxylierungsgemisch zur Hydrolyse des Amids mit gleichem Volumen 20-proz. H_2SO_4 versetzt und über Nacht am Rückfluss erwärmt. Die Benzaldimine wurden mit konz. Salzsäure sauer gestellt und ebenfalls über Nacht am Rückfluss gekocht. Das saure Gemisch extrahierte man nach Abkühlen zweimal mit Aether. Die Aetherextrakte wurden zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit wasserfreiem $MgSo_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Gewichtskonstanz eingedampft. Der Rückstand wurde teils direkt zur DC verwendet, teils methyliert und anschliessend mit GC analysiert. Bei 3-Hydroxy-benzoesäure, -benzaldehyd und -benzoesäuremethylester vereinfachte sich das Prozedere, indem nach Ansäuern das Hydroxylierungsgemisch direkt mit Aether extrahiert werden konnte.

5.2. Methylierung

Die Methylierung der durch Hydrolyse gewonnenen Substratteilgemische - Benzoesäure- und Benzaldehydderivate waren zu erwarten - erfolgte nach der in Kapitel 3 des experimentellen Teils gegebenen Vorschrift mit Dimethylsulfat und K_2CO_3 in Aceton. Dabei wurde bei der Berechnung der Zugabe von Dimethylsulfat und K_2CO_3 in der Regel eine zusätzliche zu methylierende Phenolgruppe einkalkuliert.

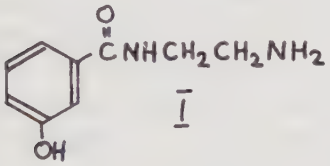
5.3. Gaschromatographie

Die GC-Analysen durften wir im GC-Labor des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel durchführen. Für sein Entgegenkommen sei Herrn Prof. C. Grob, dem Vorsteher des Instituts, an dieser Stelle gedankt.

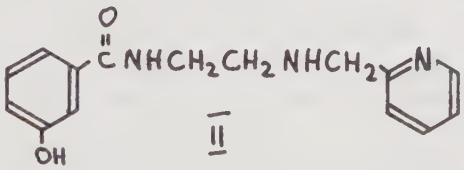
Verwendet wurde ein Perkin-Elmer F 11-Gerät mit Flammenionisationsdetektoren und ein PE-Hitachi-Schreiber Modell 159. Der Durchfluss des Trägergases (99.999-proz. Stickstoff) wurde durch eine PE-Flow-control-unit auf 50 cm^3 pro Minute konstant gehalten. Die zwei Standardsäulen (6ft x 1/4in) waren mit 10 % Carbowax 20M auf Chromosorb W (Typ AW-DMCS) beschickt (Bezugsquellennachweis in [40]). Der Thermostat des Ofens wurde auf 180° und die Injector-Heizung auf Stufe 6.4 (entspricht rund 300°) gestellt. Die zu analysierenden Substanzen wurden als 1- oder 5-proz. Lösungen in absolutem Aether mit 10-Mikrolitерspritzen (Firma Terumo bzw. Hamilton) in Mengen von 1 bis 10 Mikroliter eingespritzt. Die Differentialchromatogramme wurden mit dem Kurvenverlauf angepasster Empfindlichkeit aufgenommen und - wie schon in Kapitel 6.2. des theoretischen Teils erwähnt - nach den von Kaiser [40] beschriebenen Methoden ausgewertet.

ZUSAMMENFASSUNG

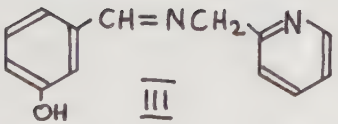
In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ein System zu finden, welches spezifische Hydroxylierungen katalysiert. Im Hinblick auf biologische Hydroxylierungen wäre die Untersuchung eines solchen Modellsystems von Interesse. Es wurden Modellsubstanzen synthetisiert (I,II,III,V), die eine 3-hydroxysubstituierte Benzoyl- oder Benzylidengruppe (Substratteil) und eine zur Metallionenkoordinierung befähigte, stickstoffhaltige Seitenkette (Aktivatorteil) aufweisen.



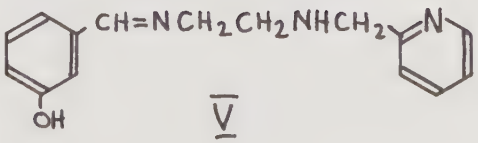
I



II



III



V

Durch Fixierung des Cu^{2+}-Ions am Aktivatorteil hoffte man eine spezifische Hydroxylierung im Substratteil zu erwirken. Zur Produktanalyse wurde der Substratteil nach hydrolytischer Abspaltung jeweils mittels Dünnschichtchromatographie oder nach Methylierung mittels Gaschromatographie untersucht.

Versuche mit Wasserstoffperoxid

Bei den Versuchen mit H_2O_2 fand vor allem die katalatische Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff statt. Im Falle der Benzamide (I und II) fand man in geringem Masse Hydroxylierung in beiden ortho-Stellungen zur Phenolgruppe. Da eine solche Hydroxylierung auch bei 3-Hydroxy-benzoesäure eintrat, konnte weder Aktivierung durch den "Aktivatorteil" noch Spezifität nachgewiesen werden. Im Falle der Benzaldimine (III und V), die in wässriger Lösung relativ unbeständig waren, wurde überhaupt keine Hydroxylierung gefunden.

Versuche mit molekularem Sauerstoff

Ausser einer geringen Aktivität von III fand man keine Hydroxylierung. Hingegen wurde durch Cu^{2+} und O_2 in basischem Milieu der Aktivatorteil von III (α-Picolylamin) oxydiert, d.h. es konnte neben unbekannten Produkten geringe Mengen von Picolinsäureamid nachgewiesen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] O. Hayaishi, "Oxygenases", Academic Press New York und London 1962.

[2] T.E. King, H.S. Mason, M. Morrison, "Oxidases and related redox systems", John Wiley & Sons New York, London, Sydney 1965.

[3] J. Peisach, P. Aisen, W.E. Blumberg, "The biochemistry of copper", Academic Press 1966.

[4] H.S. Mason, "Mechanisms of oxygen metabolism", Advances in Enzymology 19, 79 (1957).

[5] H.S. Mason. "Oxidases", Ann. Rev. Biochem. 34, 595 (1965).

[6] O. Hayaishi, "Enzymic Hydroxylation", Ann. Rev. Biochem. 38, 21 (1969).

[7] G.A. Hamilton, "Mechanism of two- and four-electron oxidations catalyzed by some metalloenzymes", Adv. Enzymology 32, 55 (1969).

[8] E.C. Slater in [2] S. 667.

[9] W.G. Levine in [3] S. 371, in [5] S. 618, in [7] S. 67.

[10] C.R. Dawson in [3] S. 305.

[11] S. Nara, K.T. Yasunobu in [3] S. 423.

[12] in [6] S. 33.

[13] P. Karlson, "Biochemie", Stuttgart 1967, S. 143.

[14] H.S. Mason in [3] S. 339.

[15] S. Friedman, S. Kaufman, J. Biol. Chem. 241, 2256 (1966).

[16] L. Shuster, Ann. Rev. Biochem. 33, 590 (1964).

[17] P. Nicholls in [1] S. 273.

[18] R.O.C. Norman in [2] S. 131.

[19] S. Udenfriend, C.T. Clark, J. Axelrod, B.B. Brodie, J. biol. Chem. 208, 731 (1954).

[20] B.B. Brodie, J. Axelrod, P.A. Shore, S. Udenfriend, J. biol. Chem. 208, 741 (1954).

[21] R. Breslow, L.N. Lukens, J. biol. Chem. 235, 292 (1960).

[22] R.R. Grinstead, J. Amer. Chem. Soc. 82, 3472 (1960).

[23] R.O.C. Norman, G.K. Radda, Proc Chem. Soc. 1962, 138.

[24] H. Staudinger, V. Ullrich, Z. Naturforsch. 19b, 409, 877 (1964).

[25] G.A. Hamilton, J. Amer. Chem. Soc. 86, 3391 (1964).

[26] V. Ullrich, K. Staudinger in "Biochemie des Sauerstoffs", Kolloquium in Mosbach 1968, Springer Verlag Berlin 1968, S. 229.

[27] in [7] S. 81.

[28] G.A. Hamilton, J.P. Friedman, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1008 (1963).

[29] G.A. Hamilton, J.P. Friedman, P.M. Campbell, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5266 (1966).

[30] G.A. Hamilton, J.W. Hanifin, J.P. Friedman, ibid. S. 5269.

[31] in [7] S. 85.

[32] W. Brackman, E. Havinga, Rec. trav. Chim. 74, 937, 1070, 1100, 1107 (1955).

[33] G. Guroff et al., Science 157, 1524 (1967).

[34] P. Donatsch, K.H. Gerber, A. Zuberbühler, S. Fallab, Helv. Chim. Acta 53, 262 (1970).

[35] A.J. Hill, S.R. Aspinall, J. Amer. Chem. Soc. 61, 822 (1939).

[36] Diss. K.H. Gerber, Basel 1971.

[37] P. Job, Ann. Chim. Phys. [9], 15, 113 (1928).

[38] E. Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer-Verlag Berlin 1962 und 1967 (und darin zitierte Originalliteratur).

[39] L.F. und M. Fieser, "Reagents for organic synthesis", J. Wiley & Sons 1967, S. 295.

[40] R. Kaiser, "Chromatographie in der Gasphase", Hochschultaschenbücher, Mannheim/Zürich 1969.

[41] H. Wieland, W. Franke, Liebigs Ann. Chem. 457, 57 (1927).

[42] R. Camps, Arch. der Pharmazie 240, 347 (1902).

[43] "Handbook of Chemistry and Physics, 44. Aufl. (1963), S. 1707.

[44] E. Hoyer, Chem. Ber. 93, 2475 (1960).

[45] Diss. H. Mäcke, Basel 1971.

[46] H.R. Mahler, E. Cordes,"Biological Chemistry", Harper & Row New York 1966.

[47] H. Sigel, Angew. Chemie 81, 161 (1969).

CURRICULUM VITAE

Am 13. Oktober 1943 wurde ich, Rudolf Johann Herzog, als Sohn des Schlossers Emil Herzog von Hornussen/AG und seiner Ehefrau Pauline, geb. Spitzmüller, in Aarau geboren.

In Pratteln besuchte ich die Primarschule und anschliessend in Basel das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium, wo ich im April 1963 die Maturitätsprüfung Typus C bestand.

Im Sommersemester 1963 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel mit Chemie als Hauptfach. Im Herbst 1964 bestand ich das 1. Vordiplom mit den Fächern Mathematik, organischer und anorganischer Chemie und im Herbst 1965 das 2. Vordiplom mit den Fächern Experimentalphysik und Zoologie. Nach dem Diplom im Frühjahr 1967 arbeitete ich bei der Firma Hoffmann-La Roche in Basel als Stagiaire.

Die vorliegende Arbeit begann ich anschliessend im Herbst 1967 unter der Leitung von Prof. Dr. S. Fallab. Neben der Dissertation gab ich im Schuljahr 1969/70 am Gymnasium Liestal Chemieunterricht. Seit März 1970 bin ich als Assistent am Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel tätig.

Für die Gewährung finanzieller Unterstützungen während eines Teils meiner Ausbildungszeit danke ich dem Kanton Basel-Landschaft und der Schweizerischen Gesellschaft für Chemische Industrie.

Herrn Prof. Dr. S. Fallab möchte ich an dieser Stelle für sein Wohlwollen und seine Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt ferner Herrn PD Dr. H. Sigel für wertvolle Diskussionen bei der Niederschrift, Herrn Dr. B. Prijs für die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes und Frl. I. Falk für die Reinschrift der vorliegenden Arbeit.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten:

P. Baertschi, M. Brenner, H. Brintzinger, P. Buchner, P. Diehl, M. von Eckardt, H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, F. Gerson, C. Grob, P. Huber, Th. Kaden, P. Leepin, E. Miescher, R. Müller, H. Nüesch, A. Portmann, B. Prijs, K. Rossmann, P. Scherrer, P. Schiess, H. Seiler, H. Sigel, Ch. Tamm, M. Thürkauf und R. Wizinger.

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld, Postfach 29